

**Zelluläre Funktionen der
Hyaluronsäure-bindenden Protease (HABP):
Aufklärung intrazellulärer Signalwege in
humanen Endothelzellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Anne Kreß

aus Marburg

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
29.03.2004 angenommen.

Erstgutachterin:	Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Zweitgutachter:	PD Dr. Johannes Dodt

Tag der mündlichen Prüfung:	07.04.2004
-----------------------------	------------

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS HÄMOSTASESYSTEM DES MENSCHEN	1
1.1.1	Die primäre Hämostase	1
1.1.2	Die sekundäre Hämostase	2
1.1.3	Die Fibrinolyse	6
1.1.4	Störungen des hämostatischen Systems	7
1.1.5	Arzneimittel zur Behandlung von Gerinnungsstörungen	9
1.2	REZEPTORVERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION IM BLUTGEFÄßSYSTEM	10
1.2.1	Aufbau und Funktion der Blutgefäße	10
1.2.2	Rezeptoren des vaskulären Systems	11
1.3	DIE HYALURONSÄURE-BINDENDE PROTEASE (HABP)	16
1.3.1	Isolierung und Struktur von HABP	16
1.3.2	Biologische Eigenschaften von HABP	19
1.4	AUFGABENSTELLUNG	23
2	ERGEBNISSE	25
2.1	EINFLUSS VON HABP AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION IN ENDOTHELZELLEN	25
2.1.1	HABP induziert eine intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung in HUVECs	25
2.1.2	HABP setzt Bradykinin auf der Zelloberfläche von HUVECs frei	31
2.1.3	Aktivierung des MAPK-Signalweges durch HABP in HUVECs	33
2.1.3.1	Die HABP-vermittelte ERK1/2-Aktivierung ist unabhängig vom B2-Rezeptor	35
2.1.3.2	Die ERK1/2-Phosphorylierung ist Pertussis- und Cholera-toxin-insensitiv	36
2.1.3.3	Das MAPK-Signal ist unabhängig von intra- bzw. extrazellulären Ca^{2+} -Ionen	37
2.1.3.4	Die ERK1/2-Aktivierung ist abhängig von der enzymatischen Aktivität	38
2.1.3.5	Die HABP-induzierte p44/42 MAPK-Aktivierung ist konzentrationsabhängig	39
2.1.3.6	Zeitabhängige Aktivierung der Proteinkinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2	39
2.1.3.7	Der FGF-Rezeptor 1 vermittelt die Aktivierung von ERK1/2	41
2.1.3.8	FGF-Antikörper neutralisieren die FGFR1-vermittelte ERK1/2-Aktivierung	42
2.1.3.9	Vergleich der FGF- und HABP-induzierten ERK1/2-Signalstärken	44
2.1.3.10	Aktivierung von MAPK-abhängigen Transkriptionsfaktoren durch HABP	45
2.1.3.11	Die Proteinkinasen p38 und SAPK/JNK werden durch HABP nicht aktiviert	48
2.1.3.12	Zusammenfassung der HABP-vermittelten Signaltransduktion in HUVECs	50
2.2	REGULATION VON HABP AUF ZELLULÄRE EBENE	53
2.2.1	HABP wird von humanen Endothelzellen internalisiert	54
2.2.2	Nachweis lysosomaler Vesikel	55
2.2.3	Bindung von HABP auf HUVEC-Zelloberfläche ist nicht nachweisbar	57
3	DISKUSSION	58
3.1	BRADYKININ-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION IN ENDOTHELZELLEN	58
3.2	FGFR1-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION IN ENDOTHELZELLEN	64
3.3	REGULATION VON HABP IM PLASMA	70
3.4	POTENTIELLE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON HABP IM GEFÄßSYSTEM	74
4	ZUSAMMENFASSUNG	80
5	MATERIALIEN UND METHODEN	82
5.1	MATERIALIEN	82
5.1.1	Chemikalien	82
5.1.2	Proteine, Enzyme und Inhibitoren	82
5.1.3	Standards und Kits	82
5.1.4	Säulenmaterialien	82
5.1.5	Verbrauchsmaterialien	83
5.1.6	Geräte	83
5.1.7	Antikörper	84
5.1.8	Zellkulturmaterialien	85
5.1.9	Puffer und Lösungen	86
5.1.10	Zellkulturmedien und -lösungen	88

5.2	METHODEN	90
5.2.1	<i>Zellkulturtechniken</i>	90
5.2.1.1	Isolierung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	90
5.2.1.2	Kultivierung und Passagieren von HUVECs	91
5.2.1.3	Kryokonservierung	91
5.2.1.4	Auftauen von Zellen	91
5.2.1.5	Trypanblau-Ausschlußfärbung	92
5.2.2	<i>Zellbiologische Methoden</i>	92
5.2.2.1	Mycoplasmen-Test (DAPI-Färbung)	92
5.2.2.2	Verifizierung von Endothelzellen mittels von Willebrand-Faktor -Nachweis	93
5.2.2.3	Identifizierung von Endothelzellen mittels Dil-markiertem acetyliertem LDL	94
5.2.2.4	Immunologischer Nachweis von HAPB mittels Immunfluoreszenz	94
5.2.2.5	Nachweis lysosomaler Vesikel mit LysoTracker	95
5.2.2.6	Mowiol-Einbettung von Fluoreszenz-Präparaten	96
5.2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie	96
5.2.2.8	Präparation von Zelllysaten nach Stimulation	96
5.2.2.9	Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$)	97
5.2.2.9.1	Messung im Lumineszenzspektrometer LS-50 B mit Fura 2	97
5.2.2.9.2	Messung im Fluoroskan Ascent FL Fluorometer mit Fluo 3	99
5.2.2.10	Radioimmunoassay (RIA) zum Nachweis von Bradykinin	100
5.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	101
5.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	101
5.2.3.2	Western Blot-Analyse	102
5.2.3.2.1	Elektrotransfer von Proteinen	102
5.2.3.2.2	Immunodetektion von geblotteten Proteinen	102
5.2.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	103
5.2.3.3.1	Absorptionsmessung von Proteinlösungen	103
5.2.3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure	103
5.2.3.4	Isolierung von HAPB	103
5.2.3.4.1	Anionenaustauschchromatographie mit Q Sepharose FF	104
5.2.3.4.2	Affinitätschromatographie mit Aprotinin-Eupergit	104
5.2.3.4.3	Konzentrieren mit Anionenaustauscher Q Sepharose FF	105
5.2.3.4.4	Messung der enzymatischen Aktivität von HAPB	106
6	LITERATURVERZEICHNIS	107
7	ANHANG	121
7.1	ABKÜRZUNGEN	121
7.2	EIGENE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	124
	LEBENS LAUF	125
	DANKSAGUNG	126
	ERKLÄRUNG	127

1 Einleitung

1.1 Das Hämostasesystem des Menschen

Im physiologischen Zustand zirkuliert das Blut in einem geschlossenen Gefäßsystem, ohne dass es zum Sistieren des Blutflusses oder zum Blutaustritt in das umliegende Gewebe kommt. Traumatische Einwirkungen auf die Gefäßwand, wie bei Schnittwunden, führen zur Aufhebung der Gefäßwandintegrität und nachfolgend zur Blutung in das umliegende Gewebe. Im Falle einer Gefäßverletzung stellt das Hämostasesystem einen sehr wichtigen Schutzmechanismus dar, da es für eine Minderung des Blutverlustes sorgt und die ersten Schritte der Wundheilung einleitet. Weiterhin versteht man unter dem Begriff der Hämostase jedoch auch die Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Fluidität und Zirkulation des Blutes beitragen und somit eine Blutgerinnung innerhalb des Gefäßes verhindern. Der Hämostaseapparat besteht aus der Gefäßwand (Endothel), dem Thrombozyten-System, dem plasmatischen Gerinnungssystem, den Fibrinolysekomponenten und deren Gegenspielern. Um eine verletzungsbedingte Blutung möglichst gering zu halten, bilden die zellulären Bestandteile des Blutes, die Thrombozyten, in Verbindung mit löslichen Plasmakomponenten, den so genannten Gerinnungsfaktoren, einen hämostatischen Pfropf, welcher der Abdichtung der Gefäßwandverletzung dient und zur Stillung der Blutung führt. Dies erfordert ein enges Zusammenspiel zwischen Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatischen Gerinnungsfaktoren.

Die Hämostase wird nach dem zeitlichen Ablauf in verschiedene Stadien unterteilt: Die primäre Hämostase, die sekundäre Hämostase und die Fibrinolyse. Jedes System für sich weist sowohl pro- als auch antihämostatische Mechanismen auf, die sich unter physiologischen Bedingungen in einem fein austarierten Gleichgewicht befinden und somit eine unkontrollierte Thrombusbildung verhindern. Fehlregulationen dieser Prozesse führen entweder zu einer Thromboseneigung (Thrombophilie) oder zu einer Blutungsneigung (Hämophilie).

1.1.1 Die primäre Hämostase

Während der primären Hämostase heften sich Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandläsion (Adhäsion) und bilden durch Interaktion mit weiteren Blutplättchen (Aggregation) den primär hämostatischen Thrombus. Bei einer Gefäßverletzung kommt der vom Endothel sezernierte und zum Teil in den oberflächlichen Schichten des Subendothels an Kollagenfibrillen anhaftende von Willebrand-Faktor (vWF) mit Blut in

Kontakt. Über die Interaktion des thrombozytären vWF-Rezeptors Glykoprotein Ib-V-IX mit Kollagen-immobilisiertem vWF wird der erste Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der Zellwandläsion hergestellt (GIRMA *et al.*, 1987; RUGGERI & ZIMMERMANN, 1987; LOPEZ *et al.*, 1988; HICKEY *et al.*, 1989; CLEMETSON & CLEMETSON, 2001). Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren (Kollagen-, Fibronectin- und Lamininrezeptor), welche der Rezeptorfamilie der Integrine zugeordnet werden, erfolgt eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion (SAVAGE *et al.*, 1998; FITZGERALD, 2001). Insbesondere die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors an Kollagen führt zur Aktivierung und Formveränderung der adhärenen Plättchen. Während der Formveränderung kommt es zur Bildung von Pseudopodien, welche eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion begünstigt. Während des Adhäsions- und Aktivierungsvorgangs schütten die Thrombozyten Inhaltsstoffe aus ihren α -Granula wie z. B. Thromboxan A₂ und Adenosindiphosphat (ADP) aus, wodurch eine weitere Aggregation von noch zirkulierenden Blutplättchen an die primär adhärierenden Thrombozyten im Verletzungsbereich induziert wird. Zusätzlich wirkt Thromboxan A₂ vasokonstriktorisches und begünstigt durch Verlangsamung des Blutstromes die Thrombusbildung. Die Verbindungen zwischen den aggregierten Thrombozyten werden hauptsächlich durch Fibrinogen-Moleküle gebildet, die an die Glykoprotein IIb-IIIa-Rezeptoren der Plättchen binden. Innerhalb weniger Minuten erfolgt auf diese Weise ein primärer Gefäßwandverschluss, der vorübergehend die Blutung stillt (GAWAZ, 1999; RUGGERI, 2002). Dieser initial gebildete plättchenreiche Thrombus ist jedoch relativ instabil und löst sich leicht von der Gefäßwandläsion ab. Erst die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems (sekundäre Hämostase) führt zur Stabilisierung des fragilen Plättchenaggregats.

1.1.2 Die sekundäre Hämostase

Aufgabe des plasmatischen Gerinnungssystems ist es u. a., den primären, aus Thrombozytenaggregaten bestehenden Gefäßverschluss sekundär durch die Einlagerung von Fibrin weiter zu verfestigen. Schlüsselenzym der sekundären Hämostase ist das Thrombin, welches die Bildung von löslichem Fibrin aus Fibrinogen katalysiert. Aus historischen Gründen wird die Blutgerinnung in das intrinsische und das extrinsische System unterteilt, die in eine gemeinsame Endstrecke, der Thrombin- und Fibrinbildung, münden. Die Blutgerinnung verläuft über eine komplexe Kaskade von proteolytischen Spaltungen: aus inaktiven Enzymvorstufen (Zymogenen) werden durch limitierte Proteolyse einer oder mehrerer Peptidbindungen aktive Proteasen freigesetzt, die ihrerseits

das nächste Zymogen der Kaskade aktivieren. Die an der Blutgerinnungskaskade beteiligten Enzyme werden als Gerinnungsfaktoren bezeichnet und sind bis auf die Faktoren V (FV) und VIII (FVIII) Serinproteasen. Die aktivierten Koagulationsfaktoren werden durch ein kleines „a“ gekennzeichnet (FVa, FVIIIa etc.). Alle Aktivierungen und Umsetzungen finden nicht frei im Plasma statt, sondern sind an Oberflächen gebunden, meist an Phospholipide der Thrombozyten, an Endothelbestandteile oder an Trägerproteine. Prinzipiell ist auch eine Aktivierung im Plasma möglich, diese geschieht jedoch ca. 100.000fach langsamer.

Initialer Prozess der plasmatischen Gerinnung, die zeitgleich mit der primären Hämostase (zelluläre Gerinnung) ausgelöst wird, ist die Aktivierung des extrinsischen Weges durch die Bindung von FVII an seinen subendothelialen Membranrezeptor *tissue factor* (TF). Hierdurch kommt es zur Aktivierung von FVII zu FVIIa. Der Komplex TF/FVIIa katalysiert dann die Aktivierung sowohl von FX als auch von FIX. Die Aktivierung von FIX zu FIXa führt zur Bildung eines weiteren membrangebundenen intrinsischen Tenase-Komplexes aus FIXa und FVIII, der ebenfalls FX zu FXa aktivieren kann, wodurch eine größere Menge FXa entsteht. Faktor Xa vermittelt anschließend die Spaltung und Aktivierung von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa). Sobald geringe Mengen Thrombin entstanden sind, werden FVIII und FV durch Thrombin aktiviert. FIXa kann nun mit FVIIIa den membrangebundenen intrinsischen Tenase-Komplex ausbilden. Die Aktivierung von FV führt zur Entstehung eines membrangebundenen Komplexes aus FVa, FXa und Prothrombin, dem Prothrombinase-Komplex. Diese Verknüpfung unterschiedlicher Aktivierungsvorgänge und die dadurch entstehende Amplifizierung des ursprünglichen Signals führt zu einem schnellen Blutungsstillstand (DAVIE & RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964; MANN *et al.*, 1990; MANN, 1999).

Neben der Aktivierung der Gerinnungskaskade über den extrinsischen Weg kann die sekundäre Hämostase auch über einen zweiten, intrinsischen Weg, das Kontaktphasensystem, ausgelöst werden (KAPLAN, 1978). Bei der Kontaktaktivierung wird FXII durch den Kontakt mit negativen Ladungen der subendothelialen Matrix und den aktivierten Thrombozytenoberflächen des primären Thrombus über einen selbstaktivierenden Mechanismus in FXIIa überführt und kann dadurch inaktives Präkallikrein zu aktivem Kallikrein spalten. Kallikrein wiederum kann seinerseits in einem Komplex mit hochmolekularem (HMW-)Kininogen (HK) an negativ geladenen Zelloberflächen ebenfalls FXII zu FXIIa aktivieren (WIGGINS & COCHRANE, 1979; SHORE *et al.*, 1987; SCHOUSBOE, 1993). Dieser positive Rückkopplungsmechanismus führt zu einer hohen Konzentration von FXIIa, der

FXI zu FXIa spaltet. Dieser kann wiederum FIX aktivieren und über den oben beschriebenen intrinsischen Tenase-Komplex (FVIIIa/FIXa) eine erneute FX-Aktivierung herbeiführen (THOMPSON *et al.*, 1979; SILVERBERG *et al.*, 1980; SCHMAIER *et al.*, 1999). Auf diese Weise gebildetes Thrombin kann dann Fibrinogen in Fibrin-Monomere spalten, die durch die Thrombin-aktivierte Transglutaminase FXIIIa zu Fibrin-Polymeren vernetzt werden (FENTON, 1986). Das entstehende Fibrin-Gerinnel dient der Verstärkung des primären Wundverschlusses der aggregierten Blutplättchen.

Der Ablauf der Gerinnungskaskade wird durch verschiedene im Plasma vorkommende Inhibitoren reguliert, welche die Funktion spezifischer Koagulationsfaktoren hemmen. Viele der an der plasmatischen Gerinnung beteiligten Enzyme werden durch den Serin-protease-Inhibitor (Serp) Antithrombin III (ATIII) inhibiert, der an das aktive Zentrum von Gerinnungsfaktoren bindet und diese dadurch inaktiviert. Im Zusammenspiel mit Heparin oder Heparin-ähnlichen Molekülen der Endothelzelloberfläche inaktiviert ATIII vor allem Thrombin und FXa durch irreversible Komplexbildung. In geringerem Maße werden auch die Faktoren IXa, XIa, XIIa und Plasmin, ein Enzym der Fibrinolyse, durch ATIII gehemmt.

Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus der Hämostase ist das Protein C/S-System, welches die Gerinnung durch Modulation der Aktivität der Kofaktoren FVIIIa und FVa reguliert. Die Schlüsselkomponente dieses Systems, Protein C, ist ein Vitamin-K-abhängiges Proenzym, das durch Thrombin in aktiviertes Protein C (APC), eine Serin-protease, umgewandelt wird, welche die Phospholipid-gebundenen Faktoren VIIIa und Va durch Degradation inaktiviert. Dies führt zur Inhibition der Gerinnungskaskade. Die Aktivierung von Protein C durch Thrombin geschieht nur, wenn beide Moleküle an den Endothelzellrezeptor Thrombomodulin binden. An Thrombomodulin gebunden verliert Thrombin seine prokoagulatorischen Fähigkeiten. Die Aktivierung von Protein C durch Thrombin ist ein negativer Rückkopplungsmechanismus, durch den Thrombin selbst seine überschießende Wirkung verhindert. Protein S fungiert als Kofaktor von APC, indem es die Inaktivierungsgeschwindigkeit von APC für FVIIIa und FVa beschleunigt (DAHLBECK, 2000).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Inhibitoren hemmt der *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) den extrinsischen Weg der Gerinnung, indem er den TF-FVIIIa-Komplex und FXa inaktiviert (BROZE, 1995). Weitere Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung sind die Serpine Heparin-Kofaktor II, α_2 -Makroglobulin (α_2 M), C1-Inhibitor (C1-INH) und α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 PI).

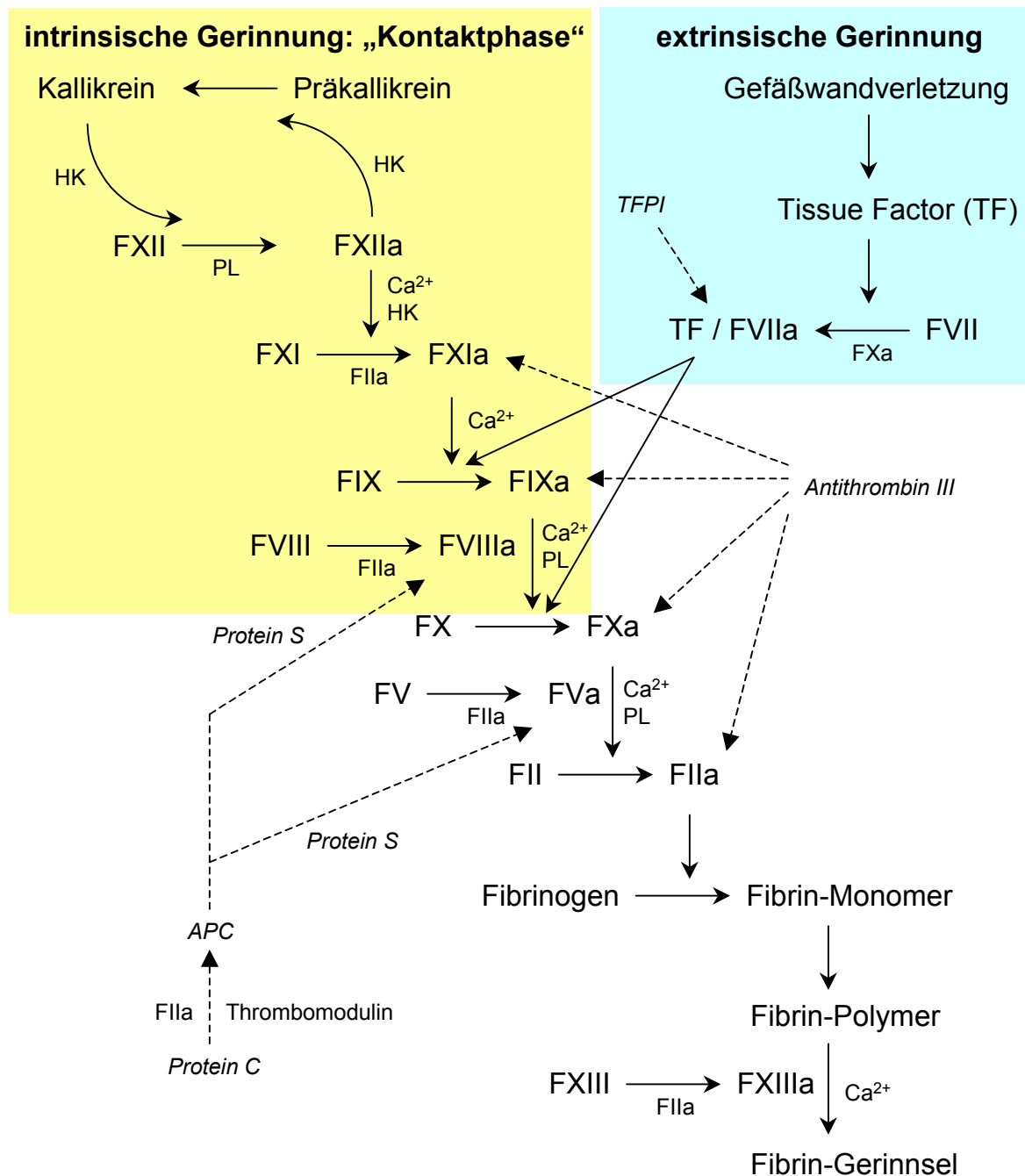


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade. Die Initiierung der Blutgerinnung erfolgt über eine komplexe enzymatische Kaskade, die in das intrinsische und das extrinsische System unterteilt wird (DAVIE & RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Beide Systeme münden in einer gemeinsamen Endstrecke der Gerinnungskaskade, die letztendlich zur Bildung eines Fibrin-Gerinnsels führt. Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden. Aktivierte Koagulationsfaktoren sind durch den Buchstaben „a“ gekennzeichnet. Gerinnungsfördernde Reaktionen sind durch durchgezogene Pfeile, gerinnungshemmende durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Abkürzungen: APC: aktiviertes Protein C, HK: HMW-Kininogen, PL: Phospholipide, TFPI: TF pathway inhibitor.

1.1.3 Die Fibrinolyse

Die Fibrinolyse wird parallel zur Kontaktaktivierung der intrinsischen Gerinnung ausgelöst und dient im Wesentlichen der Begrenzung der Gerinnselbildung und der Wundheilung bzw. Rekanalisation eines durch einen Thrombus verschlossenen Gefäßes. Während der Heilungsphase kann ein Teil des durch die Blutgerinnung entstandenen Fibrin-Thrombus im Rahmen der Fibrinolyse durch die Serinprotease Plasmin wieder aufgelöst werden. Analog zum Mechanismus des plasmatischen Gerinnungssystems findet sich beim fibrinolytischen System eine kaskadenartige Enzymaktivierung des Plasminogens.

Die Initiation der Fibrinolyse erfolgt durch FXII, der gleichzeitig die Verbindung zwischen der intrinsischen Gerinnung und der Fibrinolyse darstellt. Die bereits beschriebene Verstärkerschleife ($\text{FXIIa} \rightarrow \text{Präkallikrein} + \text{HK} \rightarrow \text{Kallikrein} + \text{HK} \rightarrow \text{FXIIa}$) produziert in großen Mengen FXIIa und Kallikrein. Kallikrein katalysiert seinerseits am Urokinase-Rezeptor (uPAR) die Umsetzung von Pro-Urokinase (pro-uPA) zu Urokinase (uPA) (ICHINOSE *et al.*, 1986), welche Plasminogen zu Plasmin spaltet. Ein weiterer Plasminogen-Aktivator, der Gewebsplasminogen-Aktivator (tPA), wird nach Stimulierung durch Thrombin von Endothelzellen freigesetzt, und kann in unmittelbarer Nähe der Fibrin-Polymere Plasminogen zu Plasmin spalten (LIJNEN & COLLEN, 1980; LEVIN *et al.*, 1984). Aktives Plasmin baut anschließend die Fibrin-Polymere zu Fibrin-Monomeren ab. Sowohl Plasminogen als auch die Plasminogen-Aktivatoren uPA und tPA besitzen eine hohe Affinität zu Fibrin. Dies gewährleistet, dass Plasmin vorwiegend am Ort der Thrombusbildung generiert wird, sodass die Lyse des Fibrins sehr spezifisch und lokal erfolgen kann (COLLEN, 1999).

Ebenso wie die primäre und sekundäre Hämostase ist auch die Fibrinolyse mehreren Regulationsmechanismen unterworfen. α_2 -Antiplasmin ($\alpha_2\text{AP}$), ein Serpin, ist der wichtigste Inhibitor des Fibrinolysesystems. Es inaktiviert freies Plasmin innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde, indem es einen stabilen $\alpha_2\text{AP}$ -Plasmin-Komplex bildet (MOROI & AOKI, 1976). Auch der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) hat eine wichtige Funktion in der Modulation der Fibrinolyse. Er hemmt sowohl tPA als auch uPA. Beim primären Wundverschluss eines Gefäßwanddefektes sezernieren die aktivierten Thrombozyten PAI-1 und verhindern dadurch eine vorzeitige Lyse des Fibrins im Wundgebiet.

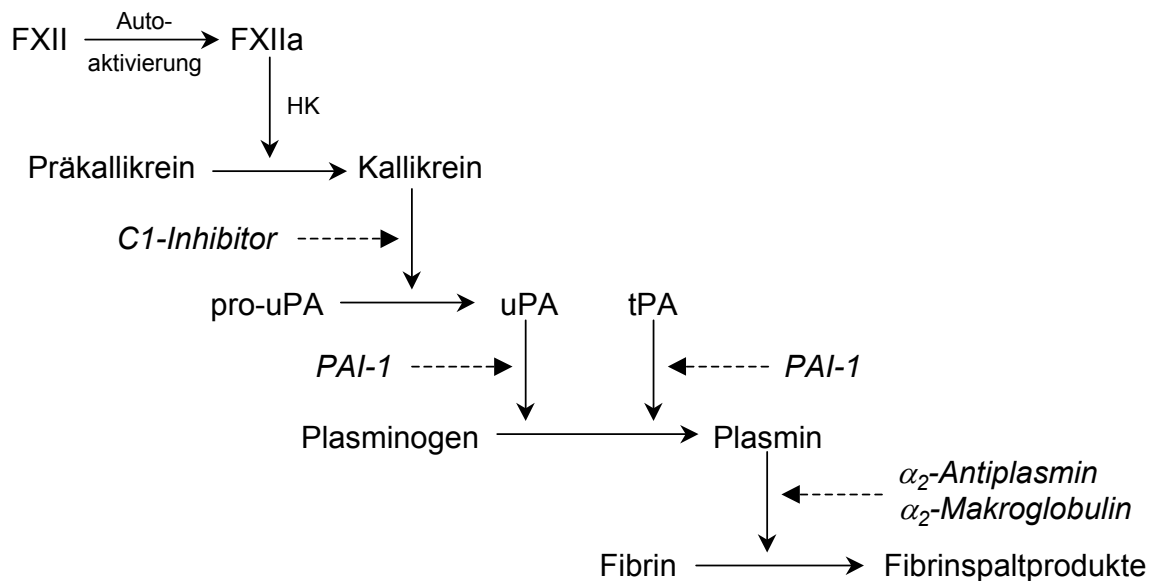


Abbildung 1.2: Schematischer Überblick über die Fibrinolyse (modifiziert nach COLMAN *et al.*, 2001). Die Fibrinolyse wird parallel zur Aktivierung des Kontaktphasensystems über FXII ausgelöst. Über eine kaskadenartige Enzymaktivierung wird Plasminogen in Plasmin umgewandelt, welches die Fibrin-Polymere des Fibrin-Thrombus durch proteolytische Spaltung abbaut und damit zur Gerinnselauflösung führt. Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden. Fibrinolysefördernde Reaktionen sind durch durchgezogene Pfeile, fibrinolysehemmende durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Abkürzungen: HK: HMW-Kininogen, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, pro-uPA: Pro-Urokinase, tPA: Gewebsplasminogen-Aktivator, uPA: Urokinase.

1.1.4 Störungen des hämostatischen Systems

Aufgrund des Aufbaus des Hämostasesystems als einer Funktionseinheit aus verschiedenen zellulären und humoralen Komponenten kann eine Thrombose- bzw. Blutungsneigung (Thrombophilie bzw. Hämophilie) durch völlig unterschiedliche Störungen hervorgerufen werden. Die dafür verantwortlichen Risikofaktoren können sowohl angeborener als auch erworbener Natur sein. Ursachen für eine Hämophilie können Störungen der Thrombozytenfunktion, des plasmatischen Gerinnungssystems, des fibrinolytischen Systems oder Defekte der Gefäßwand sein. Die sicherlich bekanntesten Gerinnungsstörungen sind die Hämophilie A und B. Die Hämophilie A beruht auf dem Fehlen oder einer verminderten funktionellen Aktivität des FVIII, verursacht durch eine vollständige Gendeletion oder eine Mutation im Strukturgen, welches X-chromosomal rezessiv vererbt wird. Die Hämophilie B wird durch einen X-chromosomal vererbten Mangel oder Defekt des FIX verursacht. Abhängig vom Ausmaß des Faktorenmangels führen sowohl die Hämophilie A als auch die Hämophilie B zu einer starken Blutungsneigung und einer verlängerten Blutungszeit. Eine weitere genetisch bedingte Störung der Blutgerinnung ist das von Willebrand-Syndrom, eine meist autosomal dominant vererbte

Blutungsneigung, die durch das Fehlen oder eine fehlerhafte Struktur des vWF-Moleküls hervorgerufen wird und sowohl das thrombozytäre System als auch das intrinsische Gerinnungssystem beeinflussen kann. Häufige Ursachen für erworbene Gerinnungsstörungen sind Synthesestörungen der Leber (Leberinsuffizienz oder Vitamin K-Mangel), Antikörperbildung gegen einen Gerinnungsfaktor oder gegen Rezeptoren der Thrombozytenmembran (Hemmkörperhämophilie), Überdosierung antikoagulatorischer Medikamente oder ein übermäßiger Verbrauch an Gerinnungsfaktoren (Verbrauchskoagulopathie). Beispielsweise verursacht ein Vitamin K-Mangel in den Hepatozyten der Leber eine verminderte Synthese funktionstüchtiger Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren (FII, VII, IX und X, Protein C und S). Vitamin K dient bei der posttranslationalen Carboxylierung von Glutamat-Resten zu γ -Carboxyglutamat am NH_2 -terminalen Ende der Vitamin K-abhängigen Faktoren als Kofaktor (LECHNER, 1977; LECHLER, 1982).

Risikofaktor für eine Thrombophilie ist zumeist eine gesteigerte plasmatische Gerinnung, die durch einen Mangel bzw. Funktionsdefekt der Inhibitoren der Gerinnung oder eine vermehrte Aktivität der prokoagulatorischen Faktoren hervorgerufen wird. Der Mangel an ATIII führt z. B. zu einer verminderten Inaktivierung von Thrombin und FXa und geht mit einem erhöhten Thromboserisiko einher. Auch Störungen im Protein C/S-System, wie der Mangel an Protein C/S oder die APC-Resistenz fördern die Gerinnung. Der Pathomechanismus der Thromboseentstehung beruht bei diesen Defekten auf einer unzureichenden Inaktivierung von FVa und FVIIIa (Protein C/S-Mangel) bzw. von FVa im Falle der APC-Resistenz, deren Ursache eine Punktmutation im FV-Gen ist, die eine wichtige Spaltstelle für APC im FVa-Molekül zerstört. Einen weiteren thrombophilen Risikofaktor stellt eine Mutation im Prothrombin-Gen dar, der eine vermehrte Produktion von Prothrombin zugrunde liegt. Im Gegensatz zu den bisher genannten Mechanismen einer erhöhten Thromboseneigung kann eine Thrombophilie auch durch eine verminderte Fibrinolyse hervorgerufen werden. Der angeborene FXII-Mangel, eine seltene Erkrankung, geht bei schweren Mangelzuständen mit einem erhöhten Thromboserisiko einher, verursacht jedoch keine Blutungsneigung. Da das extrinsische und intrinsische Gerinnungssystem eng miteinander verflochten sind, kann der Defekt durch die Aktivierung von FIX durch FVIIa ausreichend kompensiert werden. Die fehlende Aktivierung des Fibrinolysesystems durch Kallikrein, dessen Bildung durch FXIIa initiiert wird, macht sich bei schweren Mangelzuständen dagegen in einer erhöhten Thromboseneigung bemerkbar.

1.1.5 Arzneimittel zur Behandlung von Gerinnungsstörungen

Die medikamentöse Behandlung von Gerinnungsstörungen erfolgt in vielen Fällen durch Arzneimittel, die aus humanem Blutplasma gewonnen werden, so genannte Plasmaderivate. Die wichtigsten zurzeit in Deutschland als Arzneimittel zugelassenen Plasmaderivate sind Albumin, aktivierter Prothrombinkomplex, α_1 PI, anisoylierter Plasminogen/Streptokinase-Aktivator-Komplex, ATIII, C1-INH, Cholinesterase, FVII, FVIII, FVIII/vWF, FIX, FXIII, Fibrinogen, Fibrinkleber, Protein C und Prothrombinkomplex/PPSB (FII, FVII, FIX, FX, Protein C/S/Z). Die Herstellung hochgereinigter Plasmaproteinkonzentrate als Arzneimittel erfolgt durch Fraktionierung aus großen Plasmapools, wobei verschiedene Chromatographie-Techniken eingesetzt werden. Das Herstellungsverfahren muß neben einer effektiven Isolierung hohe Reinheit und Stabilität sowie höchstmögliche Sicherheit und Qualität für das Produkt gewährleisten.

Die Arzneimittelsicherheit von Präparaten, die aus humanem Blutplasma hergestellt werden, wird in Deutschland seit 1994 durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Bundesamt für Sera und Impfstoffe, staatlich überwacht, indem es für die Zulassung und Chargenprüfung von Blutzubereitungen verantwortlich ist. Zu Blutzubereitungen gehören zum einen die Blutkomponenten zur Transfusion, also therapeutische gefrorene Frischplasmen und zelluläre Komponenten wie Erythrozyten-, Thrombozyten-, Granulozytenkonzentrate und Stammzellpräparate. Zum anderen gehören hierzu aus Plasma hergestellte Blutprodukte wie Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren, Albumin und Immunglobuline. Das PEI überprüft im Rahmen der Zulassung von Blutprodukten deren Wirksamkeit, Qualität und Unbedenklichkeit. Alle aus Plasmapools hergestellten Präparate unterliegen der regelmäßigen Chargenprüfung, wobei jede Charge eines Endprodukts auf Konformität der Herstellung mit der Zulassung, Reinheit und biologische Aktivität geprüft wird. Dieses schließt Tests auf Abwesenheit kontaminierender Mikroorganismen (Sterilität) und fiebererzeugender Substanzen (Pyrogenität) ein, aber auch die Überprüfung physikalisch-chemischer Charakteristika (Gehalt und Zusammensetzung an Proteinen und Ionen, pH-Wert, Aussehen, Farbe, Löslichkeit).

1.2 Rezeptorvermittelte Signaltransduktion im Blutgefäßsystem

1.2.1 Aufbau und Funktion der Blutgefäße

Die Blutgefäße des Menschen sind von innen nach außen aus drei Schichten aufgebaut, der Intima, Media und Adventitia. Die Intima besteht aus einer einzelligen Schicht von Endothelzellen (dem Endothel), die von der subendothelialen Membran, bestehend aus Kollagen, Elastin, Mikrofibrillen, Mucopolysacchariden, Laminin, Fibronectin, vWF, Vitronectin, Thrombospondin und Fibrinogen/Fibrin, umgeben ist. Das Endothel ist das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers und kann bei einem Erwachsenen eine Fläche von bis zu 100 m² einnehmen. Die Gesamtzahl von Endothelzellen im menschlichen Blutgefäßsystem wird auf 10¹¹ geschätzt (SPORN & HUBER, 2001). Diese Endothelzellschicht bildet die Barriere zwischen dem fließenden Blut und der Media, die aus spiralförmig angeordneten glatten Gefäßmuskelzellen und deren extrazellulärer Matrix (ECM) aufgebaut ist. Die glatten Muskelzellen beeinflussen den Gefäßradius über Relaxation und Konstriktion. Die Adventitia besteht zum größten Teil aus Fibroblasten und deren ECM und stellt den Kontakt zur Umgebung des Gefäßes her (GAWAZ, 1999).

Aufgrund seiner Lokalisation zwischen der luminalen Gefäßinnenseite und den äußeren Schichten der Gefäßwand stellt das Endothel eine direkte Verbindung zwischen dem zirkulierenden Blut und den die Gefäße umgebenden Bindegewebszellen dar. Endothelzellen regulieren durch die Freisetzung zahlreicher Mediatoren, welche rezeptorvermittelte Signalkaskaden aktivieren, wichtige physiologische Prozesse wie Entzündungen, den Transport bioaktiver Moleküle und durch die Regulation der Adhäsion und Transmigration von Blutzellen die Angiogenese (Blutgefäßbildung). Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist die Regulation des Gefäßtonus. Endothelzellen setzen Substanzen frei, die entweder wie z. B. Prostacyclin über die glatten Muskelzellen eine Vasodilatation (Gefäßerweiterung) oder wie z. B. Endothelin eine Vasokonstriktion (Gefäßverengung) bewirken, und somit den Blutfluß und Blutdruck beeinflussen (CINES *et al.*, 1998). Durch den direkten Kontakt mit dem zirkulierende Blut können Endothelzellen auch mit zahlreichen biologischen Systemen des Blutes wie der Hämostase interagieren. Wie bereits in Kap. 1.1 beschrieben, laufen die dynamischen Prozesse des Hämostasesystems nicht frei im Plasma, sondern an Oberflächen gebunden statt. Die wichtigsten Oberflächen sind die Phospholipid-haltigen Membranen der aktivierten Thrombozyten im Gerinnsel und die Endothelzelloberfläche, an denen viele Gerinnungs-

prozesse ablaufen. Die Membran der Endothelzelle sezerniert eine Reihe von gerinnungsrelevanten Mediatoren und sorgt für deren Umsetzung, sodass es zur Freisetzung von prokoagulatorischen, inhibitorischen und fibrinolytischen Hämostase-Proteinen kommt. Viele Plasmaproteine des Hämostasesystems können neben ihrer pro- und antikoagulatorischen Wirkung durch eine Aktivierung von Blutgefäßzellen auch Prozesse wie die Zelladhäsion, -proliferation, -migration und den Zellstoffwechsel beeinflussen. Dieses geht zumeist mit einer rezeptorvermittelten Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen einher.

1.2.2 Rezeptoren des vaskulären Systems

Die meisten bekannten Rezeptoren in Vertebraten sind membranständige Zelloberflächenrezeptoren, die durch spezifische Bindung des Liganden an das Rezeptorprotein aktiviert werden und das Signal ins Zellinnere weiterleiten. Durch eine anschließende Konformationsänderung des Rezeptormoleküls wird auf der Innenseite der Membran ein neues, zweites Signal ausgelöst, das bis zum Zellkern weitergeleitet wird. Das übermittelte extrazelluläre Signal steuert schließlich die Transkription spezifischer Gene und beeinflusst die Aktivität bestimmter Enzyme, die den Stoffwechsel und das Cytoskelett der aktivierten Zelle kontrollieren. Obwohl Rezeptoren unterschiedlicher Art und Funktion ihre Signale auf hochkonservierten Signalwegen übertragen, bestehen zwischen den Signalwegen weitgehende Analogien, da die Signalweiterleitung über Schlüsselenzyme erfolgt. Wichtige Schlüsselenzyme intrazellulärer Signaltransduktionswege sind die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI-3K), die Proteinkinasen A und C (PKA u. PKC), die Akt-Kinase (PKB), die Phospholipase C (PLC) und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), zu denen ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/2*), SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/Jun-terminal kinase*) und p38 gehören. Eine ebenso wichtige Rolle bei der Signalübertragung spielen auch intrazelluläre Signalstoffe, so genannte *second messenger*, deren Konzentration von extrazellulären Signalen streng kontrolliert wird. Hierzu zählen zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), 1,2-Diacylglycerin (DAG), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), verschiedene Phosphoinositide, Calciumionen (Ca²⁺) und Stickstoffmonoxid (NO).

Hinsichtlich der Struktur des Rezeptorproteins, des Aktivierungs- und Signaltransduktionsmechanismus und ihrer Funktion lassen sich die Rezeptoren der Plasmamembran in verschiedene Klassen einteilen: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Tyrosin-

Kinase-Rezeptoren, Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren, Integrine, Cytokin-Rezeptoren und Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (LODISH *et al.*, 2001; HELDIN, 2002).

Neben den Membranrezeptoren gibt es auch intrazelluläre Rezeptoren, die im Cytosol oder im Zellkern lokalisiert sind und durch Bindung des Rezeptor-Liganden-Komplexes an bestimmte Regulatorsequenzen auf der DNA die Transkription regulieren. Sie kommen jedoch im Vergleich zu den membranständigen Rezeptoren nur in relativ geringer Anzahl vor. Hierzu gehören die klassischen Hormonrezeptoren für Steroide und Schilddrüsenhormone (HELDIN & PURTON, 1996).

Die größte Familie der Membranrezeptoren in Vertebraten stellen die GPCRs dar. Bis zu 2000 verschiedene GPCRs sind bis zum jetzigen Zeitpunkt identifiziert worden, was mehr als 1 % des gesamten Vertebraten-Genoms entspricht. Davon gehören etwa 1000 zu den sensorischen und Pheromon-Rezeptoren (BOCKAERT & PIN, 1999; BOCKAERT, 2002). Alle GPCRs durchspannen die Membran mit sieben Transmembranhelices, wobei sich der N-terminale Abschnitt auf der extrazellulären Seite und der C-terminale Abschnitt auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran befindet.

In vaskulären Zellen wurde in den letzten Jahren eine ganz neuartige Untergruppe der GPCRs identifiziert, die Protease-aktivierbaren Rezeptoren (PARs). Für diese Rezeptoren ist ein einmaliger Aktivierungsmechanismus charakteristisch: Im Gegensatz zu den herkömmlichen GPCRs, die durch Bindung des Liganden an den Rezeptor aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der PARs durch eine spezifische, proteolytische Spaltung des Rezeptorproteins. Als Liganden der PARs fungieren Serinproteasen, die einen großen Teil der Plasmaproteine des hämostatischen Systems darstellen. Durch ihre Fähigkeit, über die Aktivierung von Membranrezeptoren wichtige zelluläre Funktionen zu stimulieren, gehen ihre Aufgaben im Gefäßsystem über die Wirkungen klassischer Gerinnungsenzyme hinaus. Bisher sind vier verschiedene humane PARs in der Literatur beschrieben worden. PAR-1, PAR-3 und PAR-4 können durch Thrombin aktiviert werden. PAR-2 kann sowohl durch Trypsin und Tryptase (aus Mastzellen) als auch durch FVIIa und FXa aktiviert werden, aber nicht durch Thrombin (DÉRY *et al.*, 1998; COUGHLIN, 2001; MACFARLANE *et al.*, 2001). Zahlreiche Effekte im Gefäßsystem und bei der Wundheilung können auf die Wechselwirkung von Thrombin mit PARs zurückgeführt werden. Zum einen ist Thrombin der Hauptstimulus für die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, welche über den PAR-1 vermittelt werden (MACFARLANE *et al.*, 2001). Zum anderen vermittelt Thrombin in Endothelzellen die Oberflächenexpression des Plättchen-Aktivierungsfaktors (PAF) und von P-Selectin sowie die Ausschüttung von vWF. Ebenfalls über die

Aktivierung von PARs hat Thrombin eine mitogene Wirkung auf glatte Muskelzellen und Endothelzellen und trägt so zu einer Regenerierung des Gewebes bei (MCNAMARA *et al.*, 1993; HERBERT *et al.*, 1994; PREISSNER *et al.*, 2000; PREISSNER, 2000).

Ein weiterer Protease-Rezeptor des Vaskular-Systems ist der uPAR. Seine Struktur unterscheidet sich jedoch von der der PARs. Der uPAR besitzt keine typischen Transmembrandomänen, sondern ist durch einen extrazellulären Glykosylphosphatidylinositol-Anker am Carboxy-Terminus in der Plasmamembran verankert. Außerdem ist seine Aktivierung unabhängig von der enzymatischen Aktivität von uPA und benötigt keine proteolytische Spaltung des Rezeptorproteins (PÖLLÄNEN, 1991; PLOUG *et al.*, 1991; BRUNNER & PREISSNER, 1994; CHAVAKIS *et al.*, 2001). Der uPAR ist sowohl in zirkulierenden Blutzellen wie Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten als auch in Endothelzellen zu finden (VASSALLI *et al.*, 1985). Über den uPAR wird zum einen die Plasminbildung an der Zelloberfläche katalysiert, zum anderen induziert die Bindung von (pro-)uPA an den uPAR die Chemotaxis, Proliferation und Migration verschiedener Zellen (BOYLE, 1987; KIRCHHEIMER, 1989). Signale der Wachstumskontrolle können jedoch nur über die Kopplung mit anderen Rezeptoren wie β_1 - und β_2 -Integrinen vermittelt werden (PETTY & TODD, 1996; CHAVAKIS *et al.*, 2001).

Mit dem Faktor Xa-Rezeptor EPR-1 (*effector cell protease receptor-1*) wurde in zahlreichen vaskulären Zellen einschließlich Endothelzellen ein weiterer Protease-Rezeptor identifiziert (ALTIERI, 1995). Er ist aus einer einfachen Transmembrandomäne aufgebaut und spielt eine Rolle bei der Thrombin-Bildung durch den Thrombozyten-gebundenen Prothrombinase-Komplex (FXa/FVa/ Ca^{2+} /Phospholipid) (BOUCHARD *et al.*, 1997). Der EPR-1 ist sowohl für die FXa-abhängige Ausschüttung von Endothelzell-Mitogenen als auch für die proliferative Stimulation von Leukozyten und glatten Muskelzellen zuständig (PREISSNER *et al.*, 2000).

Neben den oben aufgeführten Protease-Rezeptoren des vaskulären Systems sind zahlreiche andere Rezeptoren in der Literatur beschrieben worden, die mit Proteasen der Hämostase interagieren. Die im Folgenden zusammengestellte Tabelle (Tab. 1.1) soll einen Überblick über die Vielzahl der Protease-Rezeptoren des Gefäßsystems geben. Berücksichtigt wurden hier auch Protease-Rezeptoren, die als essentielle Kofaktoren die Zusammenlagerung der Multikomponenten-Enzymkomplexe im Hämostasesystem und damit die hohe katalytische Effektivität bei der Substratumsetzung bewirken. Im Gegensatz zu den klassischen Rezeptoren (Kofaktoren) der Gerinnungskomplexe haben die strukturell nicht verwandten Rezeptoren auf Gefäßwand-Zellen und zirkulierenden

Blutzellen über rezeptorvermittelte intrazelluläre Signaltransduktion einen direkten Einfluß auf die zelluläre Aktivierung und somit auf die Proliferation und Migration der Zellen (PREISSNER *et al.*, 2000; PREISSNER, 2000).

**Tabelle 1.1: Protease-Rezeptoren und ihre Liganden im Gefäßsystem
(modifiziert nach PREISSNER *et al.*, 2000)**

Rezeptor (Vorkommen)	Protease, Ligand	Funktionen
α_2 -Makroglobulin-Rezeptor (Phagozyten, Leberzellen)	t-PA	Endocytose der Enzym-Inhibitor-Komplexe
α -Enolase (verschiedene Zelltypen)	Plasmin(ogen)	Lokalisierung des Zymogens auf biologischen Oberflächen
Annexin II (Endothel)	t-PA	Kofaktor für lokalisierte Plasmin-Bildung
EPCR (Endothel)	Protein C/Ca	Kooperation mit Thrombomodulin, anti-inflammatorischer Mediator
EPR-1 (vaskuläre und andere Zellen)	Faktor Xa	Faktor Va-unabhängige Thrombin-Bildung
Faktor Va/Phospholipid (Blutplättchen, Monozyten, Endothel)	Faktor Xa	Thrombin-Bildung über extrinsische und intrinsische Gerinnungskaskade
Mac-1 (Monozyten) / HSVcG (Endothel)	Faktor X	<i>Tissue factor</i> -unabhängige Faktor Xa-Bildung
PAR-1/3/4 (vaskuläre und andere Zellen)	Thrombin	Zell-Aktivierung (G-Protein-gekoppelt), z. B. Plättchenaggregation und Zellproliferation
PAR-2 (vaskuläre und andere Zellen)	Trypsin, Tryptase	Zell-Aktivierung (prokoagulatorisch)
Protein S/Phospholipid (Blutplättchen, Endothel)	Protein Ca	Inaktivierung der Gerinnungs-Kofaktoren Va und VIIIa, Kontrolle der Thrombin-Bildung
Thrombomodulin (Endothel)	Thrombin	Initiierung des Protein C-Antikoagulant-Kreislaufs, Hemmung der gerinnungsfördernden Funktionen des Thrombins, TAFI-Aktivierung, Degradation von pro-uPA
<i>Tissue factor</i> (Monozyten, Endothel)	Faktor VII/VIIa	Extrinsische Initiierung der Blutgerinnung (Faktor Xa-Bildung)
Tyro3 / Annexin II (vaskuläre und andere Zellen)	Protein S	Zell-Aktivierung (durch Tyrosinkinase)
uPAR (vaskuläre und andere Zellen)	uPA	Zell-Aktivierung, perizelluläre Proteolyse

Neben den Rezeptoren für funktionale Proteasen gibt es in vaskulären Zellen auch Rezeptoren, die von Spaltprodukten plasmatischer Proteasen aktiviert werden können. Hierzu zählen die Kinin-Rezeptoren B1 und B2. Kinin-Rezeptoren sind wie die PARs G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Sie werden durch Kinine aktiviert, kleine Peptide, die bei der Spaltung von HK durch die Plasmaprotease Kallikrein während der Kontaktphasenaktivierung des Hämostasesystems entstehen. Kinin-Rezeptoren sind vorwiegend in Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu finden. Durch ihre Aktivierung können vielfältige physiologische Effekte wie Vasodilatation, Relaxation

und Kontraktion glatter Muskelzellen sowie Entzündungen und Schmerz hervorgerufen werden (ERDÖS, 1979; REGOLI & BARABÉ, 1980; HALL, 1997; MARCEAU & BACHVAROV, 1998).

Essentiell für die Geweberegeneration und Angiogenese sind Rezeptoren für Adhäsionsmoleküle, Cytokine und Wachstumsfaktoren. Bei den Zelladhäsionsproteinen (*cell adhesion molecules*, CAMs) lassen sich fünf Hauptklassen unterscheiden: Cadherine, Integrine, Selectine, Mucine und die Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie (LODISH *et al.*, 2001). Von besonderer Bedeutung für Adhäsionsmechanismen der Hämostase sind die Integrine. Sie sind neben der Thrombozytenadhäsion und -aggregation auch an der Gewebeentwicklung und -differenzierung beteiligt. Weiterhin tragen sie zur Leukozytenadhäsion und -migration sowie zur Steuerung der Lymphozytenadhäsion in lymphatischen Geweben bei. Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, und interagieren mit einer Vielzahl von Glykoproteinen (z. B. Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Thrombospondin, Vitronectin, vWF) (GAWAZ, 1999; HAWIGER, 2001; SPORN & HUBER, 2001). Die Rezeptoren vieler Cytokine und Wachstumsfaktoren sind Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität. Diese Rezeptoren verfügen entweder über eine eigene katalytische Aktivität oder sind mit Tyrosinkinasen assoziiert (SCHLESSINGER, 2000). Erstere bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit Ligandenbindungsstelle, einer hydrophoben Transmembran- α -Helix und einer cytosolischen Domäne mit der Aktivität einer Tyrosin-spezifischen Proteinkinase. Nach der Aktivierung durch den Liganden und anschließender Dimerisierung und Autophosphorylierung wird dann im Cytosol eine Kaskade von Phosphorylierungen ausgelöst, die das Signal zum Zellkern weiterleitet. Die wichtigsten Wachstumsfaktorrezeptoren für die Entwicklung vaskulärer Zellen sind der VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), der bFGFR (*basic fibroblast growth factor receptor*), der PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) und der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (MUSTONEN & ALITALO, 1995; JAFFE, 1996; LODISH *et al.*, 2001). Die α -Granula der Thrombozyten beinhalten neben zahlreichen anderen Proteinen beispielsweise auch Wachstumsfaktoren wie PDGF oder bFGF. Durch die Freisetzung dieser Faktoren und die anschließende Aktivierung von vaskulären Zellen können Blutplättchen wesentliche Mechanismen der Proliferation glatter Muskelzellen und der Intimabildung beeinflussen (GAWAZ, 1999).

1.3 Die Hyaluronsäure-bindende Protease (HABP)

1.3.1 Isolierung und Struktur von HABP

Bereits 1996 wurde erstmals die Isolierung und Charakterisierung eines neuartigen plasmatischen Hyaluronsäure-bindenden Proteins (PHBP) publiziert, das im Zuge von Untersuchungen von humanem Plasma auf Hyaluronsäure-bindende Proteine durch Hyaluronsäure-Affinitätschromatographie identifiziert wurde (CHOI-MIURA *et al.*, 1996). Unabhängig davon wurde in der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, während der Reinigung von Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren aus humanem Blutplasma über Ionenaustauschchromatographie eine unbekannte proteolytische Aktivität identifiziert, die aufgrund ihrer Eigenschaften als Hyaluronsäure-bindende Protease (HABP) bezeichnet wurde (HUNFELD *et al.*, 1999). Das Protein zeigte durch die Spaltung Thrombin-spezifischer chromogener Substrate eine Thrombin-ähnliche proteolytische Aktivität. Hirudin, ein spezifischer und starker Thrombin-Inhibitor, hemmte die Aktivität von HABP nicht, jedoch der unspezifische, aber sehr effiziente Serinprotease-Inhibitor Aprotinin (aus Rinderpankreas). Dieses ließ auf die Identifizierung einer neuartigen, Thrombin-ähnlichen Serinprotease schließen. Nach der Reinigung von HABP als homogenes Protein zeigte der Vergleich von Proteinfragmentsequenzen mit Sequenzen in Proteindatenbanken eine sehr hohe, teilweise 100 %ige Homologie zu dem von CHOI-MIURA *et al.* beschriebenen PHBP, welches wegen seiner nur sehr schwachen amidolytischen Aktivität als eine degradierte Form der Plasmaprotease angesehen werden kann. Die Aminosäuresequenz der 65-70 kDa großen Serinprotease HABP ist identisch mit einem Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator-ähnlichen (HGFA-like) Protein (CHOI-MIURA *et al.*, 1996). Des Weiteren beschrieb eine dritte Arbeitsgruppe die Isolierung einer mit HABP identischen Protease, die FVII-aktivierende Eigenschaften zeigte (FVII-aktivierende Protease, FSAP; RÖMISCH *et al.*, 1999a)

Basierend auf der von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz und einem Homologievergleich mit den Sequenzen anderer bekannter Protease wurde von CHOI-MIURA *et al.* (1996) eine voraussichtliche Sekundärstruktur von HABP ermittelt. Das aus 537 Aminosäuren bestehende Protein mit einem Signalpeptid von 23 Aminosäuren am N-terminalen Ende besitzt im Bereich der schweren Kette (50 kDa) drei dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnliche Domänen (EGF 1-3) und eine *Kringle*-Domäne. Die leichte Kette (30 kDa) besteht aus der Serinprotease-Domäne mit der katalytischen Triade His₃₃₉-Asp₃₈₈-Ser₄₈₆, die dem Enzym seine Funktion verleiht. HABP weist somit eine für

zahlreiche Blutgerinnungsproteasen oder -zymogene typische Domänenstruktur auf. Im Plasma zirkuliert die Protease als einkettiges Zymogen in einer Konzentration von ca. 12 µg/mL (~ 200 nM). Die (Auto-)Aktivierung des Proenzymen erfolgt durch Proteolyse der einkettigen in die zweikettige Form an der Aktivierungsstelle Arg₂₉₀-Ile₂₉₁ und wird durch geladene Moleküle und Oberflächen wie Heparin, Poly-L-Lysin und Dextransulfat sowie durch RNA beschleunigt (ETSCHIED *et al.*, 2000; KANNEMEIER *et al.*, 2001; KANNEMEIER, 2003). In der zweikettigen Form sind die beiden Ketten durch eine von insgesamt 18 Disulfid-Brücken miteinander verbunden (CHOI-MIURA *et al.*, 1996; HUNFELD *et al.*, 1999; RÖMISCH *et al.*, 1999b). HABP ist ein Glykoprotein mit den zwei konservierten N-Glykosylierungsstellen Asn₃₁ und Asn₁₈₄ und den zwei konservierten O-Glykosylierungsstellen Thr₂₆₆ und Thr₂₇₀. Der isoelektrische Punkt von HABP liegt bei 4,9-5,5 (KANNEMEIER *et al.*, 2001). Die voraussichtliche Struktur von HABP ist in Abb. 1.3 dargestellt.

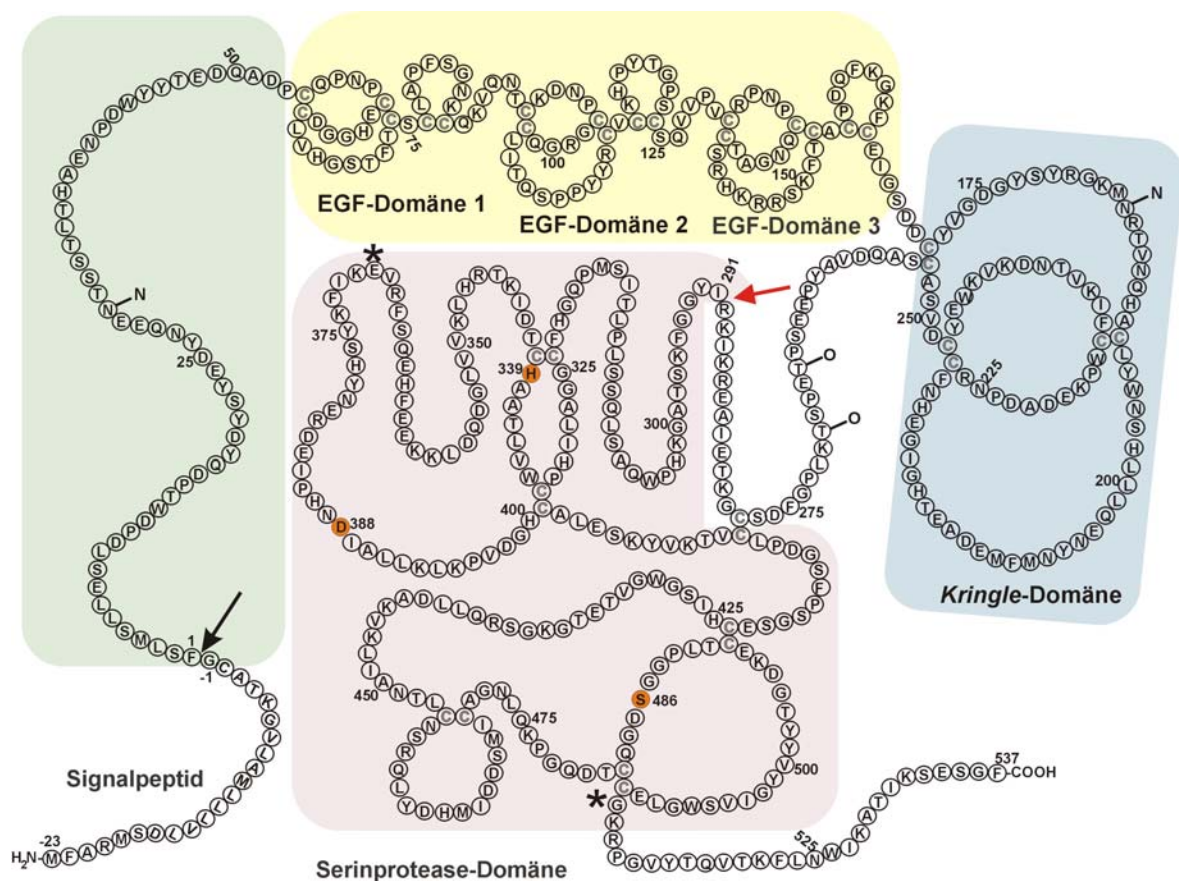


Abbildung 1.3: Voraussichtliche Struktur von HABP (modifiziert nach CHOI-MIURA *et al.*, 1996). HABP besteht aus einer leichten Kette, die die Serinprotease-Domäne (rot) enthält, und einer schweren Kette mit der Kringle-Domäne (blau) und den drei EGF-Domänen (gelb). Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind orange hinterlegt. Die Glykosylierungsstellen sind durch ‚N‘ bzw. ‚O‘ gekennzeichnet. → : Spaltstelle des Signalpeptids am N-Terminus; → : (Auto-)Aktivierungsspaltstelle. Die beiden Sterne (*) kennzeichnen die Polymorphismen FSAP Marburg I (Gly₅₁₁Glu) und FSAP Marburg II (Glu₃₇₀Gln).

Ein Sequenzvergleich der aus der Maus stammenden Proteinsequenz der Plasmaprotease mit der Sequenz der humanen HABP wies eine Homologie der beiden Proteine von 78 % auf (HASHIMOTO *et al.*, 1997).

Das humane Gen von HABP (*HABP2*) ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert. Es hat eine Länge von ca. 35 kb und besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Anhand eines Vergleichs der Exon/Intron-Organisation von Serinproteasen (ROGERS, 1983) konnte gezeigt werden, dass HABP eine große Ähnlichkeit zu FXII, tPA und uPA (SUMIYA *et al.*, 1997), sowie zum Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator (HGFA) (MIYAZAWA *et al.*, 1998) aufweist. Aufgrund ihrer Serinprotease-Domänen und ihrer N-terminalen Domänen werden die oben aufgeführten Serinproteasen von MIYAZAWA *et al.* zur tPA/FXII/HGFA-Familie zusammengefaßt.

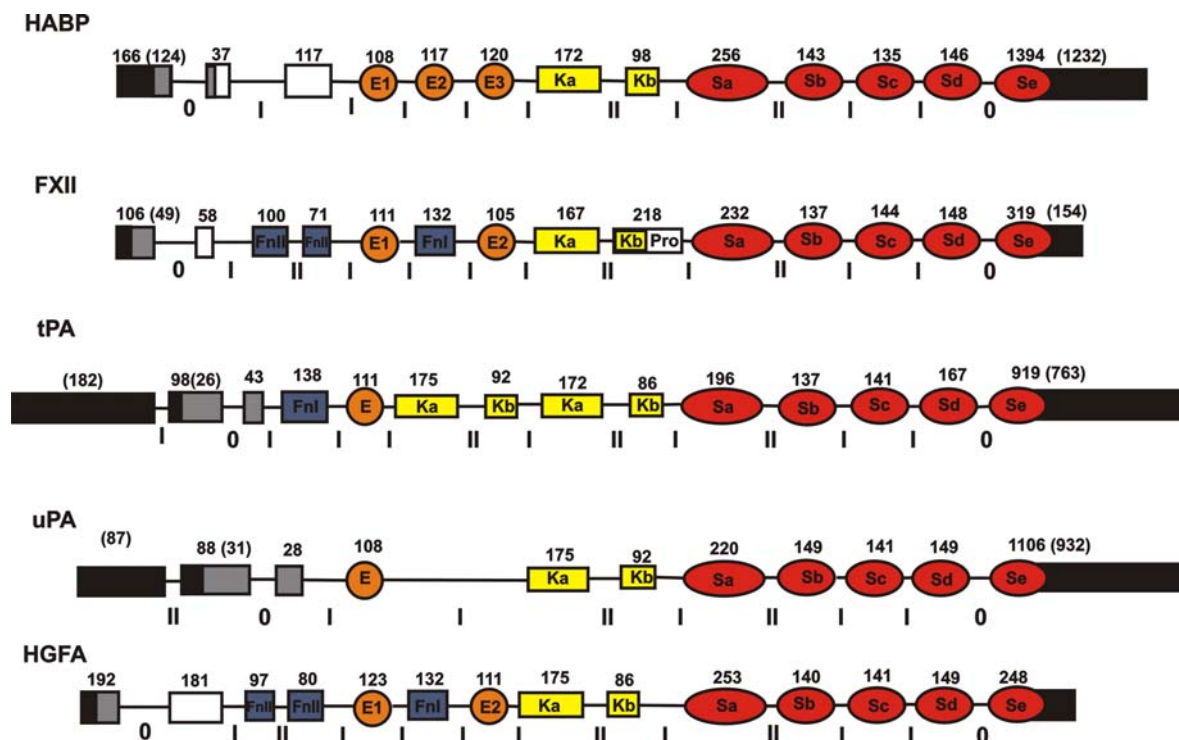


Abbildung 1.4: Vergleich der Exon/Intron-Organisation von HABP mit der anderer Serinproteasen. HABP weist eine große Ähnlichkeit zum Gewebsplasminogen-Aktivator (tPA), zu Urokinase (uPA), zum Gerinnungsfaktor XII und zum Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator (HGFA) auf. Die in dieser Abb. gezeigten Serinproteasen werden aufgrund ihrer Serinprotease-Domänen und ihrer N-terminalen Domänen von MIYAZAWA *et al.* (1998) auch zur tPA/FXII/HGFA-Familie zusammengefaßt. rot: Serinprotease-Domäne, gelb: Kringle-Domäne, orange: EGF-Domänen, blau: Fibronectin-Homologie-Region (Typ I u. II).

Im Rahmen einer epidemiologischen Studie wurden kürzlich zwei Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP) im HABP-Gen identifiziert, die in einem Aminosäureaustausch in der Nähe des C-Terminus der Protease resultieren. Die beiden Mutationen wurden in 5-10 % der getesteten Plasmaproben gefunden und als *FSAP Marburg I* (Gly₅₁₁Glu) bzw. *FSAP Marburg II* (Glu₃₇₀Gln) bezeichnet (siehe Abb. 1.3). Während für den *Marburg II*-Polymorphismus bisher noch kein biologischer Effekt festgestellt werden konnte, konnte für den *Marburg I*-Polymorphismus eine Korrelation der Mutation mit einem verringerten pro-uPA-aktivierenden Potential durch HABP in den Plasmen verzeichnet werden. Die untersuchten Proben zeigten eine um 50-80 % reduzierte pro-uPA-Aktivierung, deren Folge eine verlangsamte Fibringerinnauflösung ist (RÖMISCH *et al.*, 2002). Daraus resultierend wird HABP als neuer Risikofaktor für Arteriosklerose diskutiert, dessen Wirkungsmechanismus jedoch noch ermittelt werden muß. In histologischen Studien, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, konnte HABP in der Umgebung der Schaumzellen in arteriosklerotischen Plaques identifiziert werden. Dies weist auf eine physiologische Bedeutung der Protease in der Arteriosklerose hin (WILLEIT *et al.*, 2003).

1.3.2 Biologische Eigenschaften von HABP

Aus ersten Untersuchungen zur Expression von HABP in verschiedenen humanen Geweben ging hervor, dass die mRNA der Protease in Leber, Niere und Pankreas im Northern Blot detektiert werden konnte. Da die in der Leber nachgewiesenen mRNA-Mengen sehr hoch waren, wurde vermutet, dass HABP vorwiegend dort synthetisiert wird (CHOI-MIURA *et al.*, 1996). Weitere immunhistologische Studien zur Gewebsverteilung von HABP bestätigten diese Ergebnisse. Eine große Anzahl epithelialer Gewebeschnitte u. a. aus Lunge, Leber, Niere und Plazenta zeigten eine Positivfärbung für HABP. Jedoch konnte noch keine definitive Aussage darüber getroffen werden, bei welchen dieser Gewebe es sich um den Synthesort von HABP handelt, und mit welchen HABP extrazellulär assoziiert ist (KNOBLAUCH *et al.*, 2002). Die hohe Affinität von HABP zu Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen und Hyaluronsäure läßt darauf schließen, dass das Enzym besonders an Zelloberflächen und Komponenten der ECM zu finden ist. Sowohl die Bindung von HABP an endotheliale ECM als auch die Interaktionen mit Matrix-Komponenten wie Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin wurden beobachtet (CHOI-MIURA *et al.*, 2001).

Zur biologischen Funktion von HABP im Plasma gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch relativ wenige Informationen. Die Beobachtungen verschiedener prokoagulatorischer und

profibrinolytischer Eigenschaften von HABP deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei HABP um ein Enzym mit einer dualen Rolle in Gerinnung und Fibrinolyse handelt. Als erste biologische Substrate der Plasmaprotease wurden tPA und uPA beschrieben. HABP ist in der Lage, die Proenzyme dieser beiden Plasminogen-Aktivatoren durch proteolytische Spaltung in die aktive Form zu überführen (RÖMISCH *et al.*, 2000). Zudem kann HABP in der Abwesenheit von TF FVII aktivieren (RÖMISCH *et al.*, 1999a). Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten außerdem, dass sowohl HMW-Kininogen (HK) als auch LMW-Kininogen durch HABP *in vitro* gespalten werden können und dabei das vasoaktive Peptid Bradykinin (BK) und aktiviertes Kininogen (HKa) bzw. geschnittenes LMW-Kininogen (LKc) freigesetzt werden (ETSCHIED *et al.*, 2002a), ebenso wie bei der Spaltung des HK-Moleküls durch Kallikrein (siehe Abb. 1.5). Durch seine HK-aktivierenden Eigenschaften kann HABP möglicherweise die Aktivierung des Kontaktphasensystems der intrinsischen Gerinnung herbeiführen. Somit nimmt HABP im Hämostasesystem eine Kallikrein-ähnliche Funktion ein, was auch dadurch unterstützt wird, dass HABP, ebenso wie Kallikrein, pro-uPA aktivieren kann.

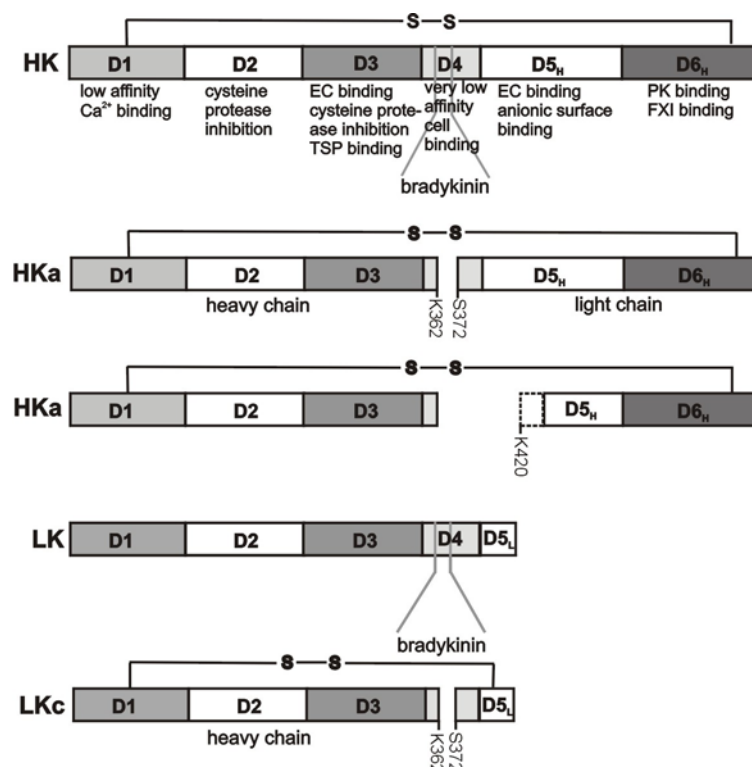


Abbildung 1.5: HABP setzt durch Spaltung von HMW- und LMW-Kininogen Bradykinin frei. Dargestellt sind die Domänenstruktur von HK und LK sowie das durch die HABP-vermittelte Spaltung entstehende Produkt Bradykinin. HK und LK sind Spleißprodukte eines gemeinsamen Gens (TAKAGAKI *et al.*, 1985). Die dargestellte Domänenstruktur geht auf ZHANG *et al.* (2000) und COLMAN (2001) zurück. Abkürzungen: HK: HMW-Kininogen, HKa: aktiviertes HMW-Kininogen, LK: LMW-Kininogen, LKc: geschnittenes LMW-Kininogen.

Als weitere Substrate von HABP wurden in der Zwischenzeit sowohl Fibrinogen (CHOI-MIURA *et al.*, 2001) als auch, als intrazelluläres Substrat, ein Transkriptionsfaktor des Amyloid- β -Proteins (VOSTROV & QUITSCHE, 2000) beschrieben. Beide werden von HABP proteolytisch gespalten und dadurch inaktiviert.

Durch die Identifizierung verschiedener Substrate für HABP, die sowohl im Gerinnungssystem als auch in der Fibrinolyse angesiedelt sind, kann die Protease als ein weiterer prokoagulatorischer und profibrinolytischer Aktivator eingeordnet werden, der auf unterschiedliche Art und Weise Einfluß auf die Hämostase nehmen kann. Dennoch wurde *in vitro* auch die proteolytische Inaktivierung von FV und FVIII nachgewiesen (RÖMISCH *et al.*, 1999a), was sich wiederum negativ auf die Gerinnung auswirkt und auf einen antikoagulatorischen Effekt von HABP hindeutet. Aufgrund dieser Befunde kann eine potentielle Rolle von HABP im hämostatischen System postuliert werden. Dies ist in schematischer Form in Abb. 1.6 dargestellt.

In vitro-Studien zum Inhibitorprofil von HABP zeigten, dass sowohl zahlreiche plasmatische Serpine, nämlich der C1-INH, α_2 AP, ATIII/Heparin und PAI-1, als auch der Kunitz-Typ-Inhibitor Inter- α -Inhibitor als potentielle physiologische Inhibitoren der Plasmaprotease in Frage kommen (ETSCHIED *et al.*, 2002b). Inwieweit dies unter physiologischen Bedingungen einen Einfluß auf die Wirkungen von HABP im Hämostasesystem haben kann, ist noch nicht bekannt.

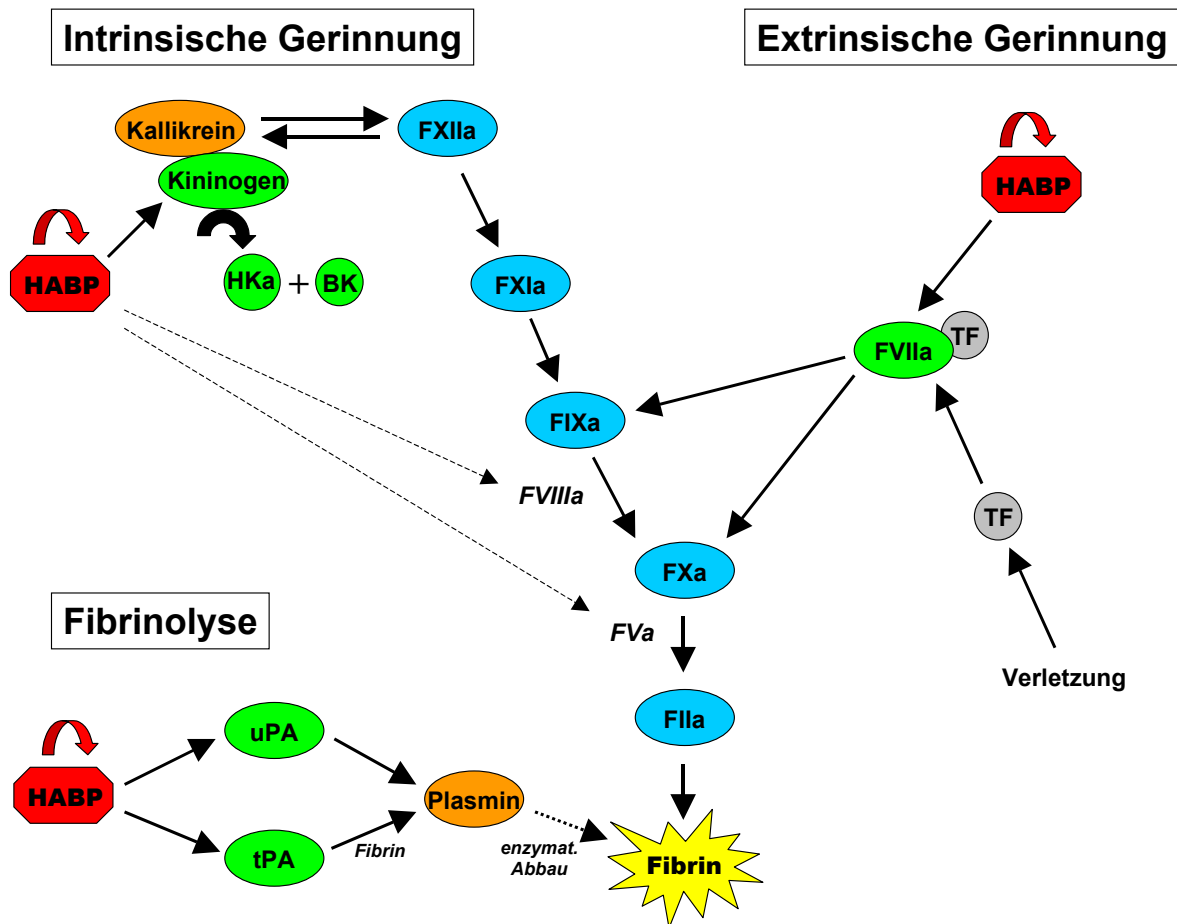


Abbildung 1.6: Die potentielle Rolle von HABP in der Hämostase. Eine mögliche physiologische Funktion von HABP im Hämostasesystem ist derzeit noch nicht bekannt. Die vorliegende Abb. stellt die potentielle Rolle von HABP in der Hämostase in Form eines hypothetischen Schemas dar (basierend auf den in Kap. 1.3.2 beschriebenen Befunden). Der prokoagulatorische Einfluß von HABP kann sowohl von der TF-unabhängigen Aktivierung von FVII als auch von der Aktivierung des Kontakphasensystems über die Spaltung und Aktivierung von HK ausgehen. Durch die Aktivierung von uPA und tPA zeigt HABP eine profibrinolytische Wirkung. Negative Effekte auf die Gerinnung können jedoch durch die HABP-vermittelte Inaktivierung der Kofaktoren FV und FVIII hervorgerufen werden. Abkürzungen: BK: Bradykinin, HK: HMW-Kininogen, HKa: aktiviertes HMW-Kininogen, TF: tissue factor, tPA: Gewebsplasminogen-Aktivator, uPA: Urokinase.

1.4 Aufgabenstellung

Mit der Identifizierung verschiedener Substrate wie FVII, uPA, tPA, HK, FV und FVIII wurden bisher unterschiedliche Effekte von HABP auf das Hämostasesystem beschrieben. Dennoch ist die biologische Funktion von HABP im Plasma in Bezug auf die Hämostase noch unklar, da die enzymatische Aktivität durch plasmatische Inhibitoren unter physiologischen Bedingungen schnell gehemmt werden kann. Die essentiellen Prozesse der Gerinnung und Fibrinolyse laufen nicht frei im Plasma sondern in Komplexen an zellulären Oberflächen der Endothelzellen und Thrombozyten ab. Als im zirkulierenden Blut enthaltenes Plasmaprotein steht HABP in direktem Kontakt zu dem die Blutgefäße auskleidenden Endothel. Aufgrund dessen liegt die Vermutung nahe, dass HABP möglicherweise mit Blutgefäßzellen interagiert. Eine zentrale Frage dieser Arbeit stellten daher Untersuchungen zur zellulären Funktion von HABP basierend auf der rezeptorvermittelten Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen dar.

Sowohl die hohe Affinität von HABP zu Hyaluronsäure und Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen (CHOI-MIURA *et al.*, 1996) als auch ihre Interaktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche (CHOI-MIURA *et al.*, 2001) gaben erste Hinweise darauf, dass die potentielle physiologische Funktion von HABP möglicherweise in direktem Zusammenhang mit Zellen des Blutgefäßsystems steht. Auch die Proteinstruktur von HABP mit der *Kringle*- und den EGF-Domänen deutet auf Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Zelloberflächenmolekülen hin. Des Weiteren wurden in der Literatur zahlreiche Beispiele von Plasmaproteasen der Hämostase mit zellgerichteter Funktion publiziert, zu denen uPA, FXa, Thrombin und Protein C gehören (PREISSNER *et al.*, 2000; PREISSNER, 2000) (siehe auch Kap. 1.2).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen erste Informationen zur Aktivierung von Blutgefäßzellen durch HABP vor, die die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs) und der Nabelschnurarterie (HUAECs) beschrieben (STORCK *et al.*, 1999). Die anfängliche Vermutung, dass einer der bereits bekannten endothelialen Protease-Rezeptoren PAR-1/2/3/4 bzw. EPR-1 von HABP aktiviert wird, wurde jedoch nach Durchführung von Stimulationsexperimenten, in denen HABP in Kombination mit den Agonisten dieser Rezeptoren Thrombin (PAR-1/3/4), Trypsin (PAR-2) oder FXa (EPR-1) eingesetzt wurde, ausgeschlossen. Auch die Ausschüttung von TF und vWF, häufige Folgereaktionen der Aktivierung von Endothelzellen, wurde nicht nachgewiesen. Diese Ergebnisse ließen auf die Existenz eines neuartigen Rezeptors für HABP auf Endothelzellen schliessen, der die beobachtete

Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) vermittelt. Ein grundlegendes Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung dieses Rezeptors. Einen ersten Anhaltspunkt auf der Suche nach einem solchen Rezeptor gaben Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe, die die Kallikrein-ähnlichen Eigenschaften von HABP demonstrierten. *In vitro*-Studien zeigten, dass HABP in der Lage ist, HK enzymatisch zu spalten und dabei das vasoaktive Peptidhormon BK freizusetzen (ETSCHIED *et al.*, 2002a). Da aus Publikationen bekannt ist, dass BK direkt mit humanen Endothelzellen interagieren und einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auslösen kann (FREAY *et al.*, 1989; BUSSE & FLEMING, 1996), lag die Vermutung nahe, dass HABP durch die proteolytische Spaltung von Zelloberflächen-assoziiertem HK BK freisetzt, und dieses möglicherweise als sekundäres Signal über seinen endothelialen Rezeptor B2 (B2R) die Ca^{2+} -Mobilisierung induziert.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ermittelt werden, über welchen Rezeptor die beobachtete HABP-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in HUVECs ausgelöst wird, und ob ein eventueller Zusammenhang zu der HABP-vermittelten BK-Freisetzung und einer möglichen B2R-Aktivierung besteht. Zur Beantwortung dieser Frage wurde auch ein direkter Nachweis von BK in HABP-behandelten Zellüberständen hinzugezogen. Die Aufklärung möglicher HABP-induzierter intrazellulärer Signaltransduktionswege und die Identifizierung daran beteiligter Zelloberflächenrezeptoren standen somit im Vordergrund der Untersuchungen. Zusätzlich wurden in immunologischen Studien Mechanismen zur Regulation von HABP auf zellulärer Ebene untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen eine Interpretation der zellulären Funktionen von HABP im Hinblick auf eine potentielle physiologische Bedeutung der Plasmaprotease ermöglichen.

2 Ergebnisse

Ausgehend von den zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Informationen zur Aktivierung von HUVECs durch HABP stand die Identifizierung von endothelialen HABP-aktivierbaren Rezeptoren im Mittelpunkt der im Folgenden beschriebenen Studien. Hierzu sollte zunächst geklärt werden, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Mobilisierung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen und der HABP-vermittelten Freisetzung von BK aus HK besteht und die Bildung von BK auf der Zelloberfläche von HUVECs in Zellüberständen nachzuweisen ist. Zudem sollten weitere Möglichkeiten der HABP-induzierten Signaltransduktion in HUVECs untersucht und deren Mechanismen aufgeklärt werden. In Immunfluoreszenzexperimenten wurde das Vorhandensein von endothelialen Rezeptoren für HABP überprüft.

2.1 Einfluß von HABP auf die Signaltransduktion in Endothelzellen

2.1.1 HABP induziert eine intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung in HUVECs

Basierend auf den im Vorfeld der vorliegenden Arbeit von STORCK *et al.* (1999) durchgeführten Studien zur Aktivierung von HUVECs durch HABP wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der beobachteten Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern mit einer kommerziell erhältlichen HUVEC-Kultur überprüft. Diese Zelllinie erwies sich jedoch aufgrund zu hoher Passagen (> 5. Passage) und eines zu weit fortgeschrittenen Differenzierungsgrades für die geplanten Untersuchungen als ungeeignet. Da zwischen der Ca^{2+} -Mobilisierung und der HABP-vermittelten Freisetzung von BK aus HK ein Zusammenhang vermutet wurde, der auf einer Aktivierung des BK-Rezeptors B2 (B2R) durch freigesetztes BK basierte, mußte eine grundlegende Voraussetzung für diese Studien die Funktionalität des B2R sein. In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen wird dieser Rezeptor von HUVEC-Kulturen nur bis zur 3. Passage exprimiert (pers. Mitteilung von I. Fleming, Universitätsklinikum Frankfurt), sodass die Etablierung einer Primärzellkultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene unabdingbar war. Diese HUVEC-Primärkultur gewährleistete, dass die Experimente zur Untersuchung der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung mit möglichst niedrigen Passagen (1. bis 3. Passage) durchgeführt werden konnten. Nach erfolgreicher Etablierung der Präparations- und Kultivierungsmethode von primären HUVECs wurde das neue Testsystem dahingehend überprüft, ob eine HABP-induzierte Aktivierung in Form der intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen nachzuweisen war.

Mit Hilfe Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe wie Fura 2 oder Fluo 3 können Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen werden. Die Verwendung der membrangängigen, ungeladenen Form dieser Ca^{2+} -Indikatoren als Azetoxymethylester (Fura 2/AM bzw. Fluo 3/AM) gewährleistet eine Diffusion des Farbstoffes durch die Plasmamembran. Endogene Esterasen spalten den Azetoxymethylesterrest im Cytoplasma ab, sodass der Farbstoff als Anion vorliegt und nun Ca^{2+} -Ionen binden kann. In dieser Form kann er nicht mehr durch die Plasmamembran diffundieren und reichert sich im Cytoplasma an. Beim Einsatz von Fura 2 macht man sich zunutze, dass der Farbstoff bei Bindung von Ca^{2+} sein Anregungsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen verschiebt und damit in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Verschiebung der optimalen Anregungswellenlänge von 380 nm nach 340 nm erfolgt. Im Falle von Fluo 3 kommt es bei einer Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit der Calciumbeladung des Indikators.

Unter Verwendung der im eigenen Labor etablierten HUVEC-Primärkultur wurde die Reproduzierbarkeit des in den vorangegangenen Studien beobachteten HABP-induzierten Anstiegs des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erneut überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Zellen der Passagen 1, 2 oder 3 auf Fibronectin-beschichteten Quarzobjektträgern ausgesät und für 24 h in MCDB131 (+ 8 % FBS) kultiviert. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen zur Beladung mit dem Ca^{2+} -Indikator 1 h bei 37°C mit 5 μM Fura 2/AM und 0,025 % (w/v) Pluronic F-127 in HMTS (*HEPES-modified Tyrode's solution*) inkubiert und anschließend gewaschen. Die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgte in einem Fluoreszenzspektrometer, dessen Küvettenhalterung über einen Umwälz-Thermostat auf 37°C temperiert wurde. Der mit HUVECs bewachsene Objektträger wurde kurz vor Beginn der Messung in einer mit 3 mL HMTS befüllten und auf 37°C temperierten Küvette senkrecht positioniert. Die Anregung der Fura 2-beladenen Zellen erfolgte alternierend mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, während die resultierende Emission bei 510 nm aufgezeichnet wurde. Die Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geht auf die Methode von GRYNKIEWICZ *et al.* (1985) zurück (siehe Kap. 5.2.2.9.1).

Ausgehend von einer intrazellulären Basiskonzentration von 50-100 nM freiem Calcium führte die Stimulation mit 500 nM HABP in den Endothelzellen zu einem deutlichen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um ca. 300 nM (Abb. 2.1). Ähnlich starke Signale wurden auch mit 250 nM und 125 nM HABP erzielt, wohingegen niedrigere HABP-Konzentrationen in schwächeren Signalen resultierten (nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob die HABP-vermittelte Aktivierung von HUVECs abhängig von der enzymatischen

Aktivität der Protease ist, wurden die Zellen mit Aprotinin-gehemmter HABP inkubiert. Hierfür wurde das Enzym mit einem 10fachen molaren Überschuss Aprotinin vorinkubiert. Es zeigte sich, dass die Aprotinin-gehemmte und damit enzymatisch inaktive Protease keine Aktivierung der Zellen auslöste (Abb. 2.1).

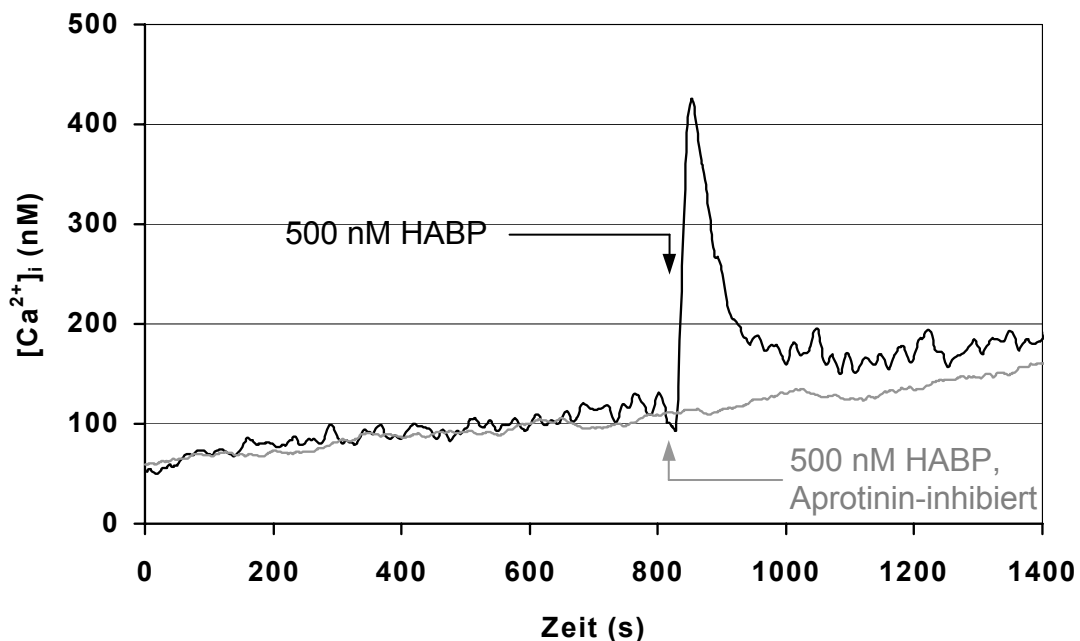


Abbildung 2.1: HABP induziert in HUVECs in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Konfluente HUVEC-Monolayer wurden für 1 h mit 5 μ M Fura 2/AM und 0,025 % (w/v) Pluronic F-127 beladen, gewaschen und die Messung in einem Fluoreszenzspektrometer gestartet. Zunächst wurde die Basiskonzentration der freien Ca^{2+} -Ionen ermittelt. Die Stimulation der Zellen erfolgte 10-15 min nach dem Start der Messung durch Zugabe von 500 nM HABP oder Aprotinin-inhibierter HABP. Die gezeigten Messungen sind exemplarisch für mindestens fünf weitere voneinander unabhängige Messungen.

Da die von STORCK *et al.* beobachteten Befunde mit einem anderen Testsystem ermittelt wurden, in dem die Zellen während der Messung in einer thermostatisierten (37°C) Zellkammer inkubiert wurden, welche auf einem mit einem Fura 2-Meßsystems aufgerüsteten inversen Mikroskop montiert war, wurden auch die innerhalb dieser Studien bereits durchgeführten Kontrollexperimente noch einmal wiederholt. Zunächst wurde durch die Vorinkubation der Zellen mit EGTA (5 mM) oder Thapsigargin (1 μ M) ermittelt, ob es sich bei dem beobachteten Signal um einen intra- oder extrazellulären Calciuminflux handelt. EGTA komplexiert im extrazellulären Inkubationspuffer die Ca^{2+} -Ionen, während Thapsigargin als spezifischer Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Reticulums (ER) eine Entleerung des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers ER hervorruft. Ebenso

wie schon von STORCK *et al.* gezeigt, induziert HABP in HUVECs eine Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern, da das Signal durch Thapsigargin blockiert wurde, aber durch EGTA unbeeinflusst blieb (nicht gezeigt). Auch die durchgeführten Kreuzstimulationsexperimente zur Überprüfung der Aktivierung der bereits bekannten endothelialen Protease-aktivierbaren Rezeptoren (PAR-1 bis PAR-4, EPR-1) durch HABP bestätigten die von STORCK *et al.* ermittelten Daten. Die Zellen wurden zu diesem Zweck entweder mit HABP als erstem Stimulus und den Agonisten der oben genannten Rezeptoren Thrombin (PAR-1/3/4), Trypsin (PAR-2) oder FXa (EPR-1) als zweitem Stimulus oder in umgekehrter Reihenfolge behandelt. Ganz gleich, ob HABP als erster oder zweiter Stimulus eingesetzt wurde, war eine Aktivierung der Zellen unabhängig vom anderen Stimulus zu beobachten, sodass HABP keinen Einfluß auf die Aktivierung dieser Rezeptoren hat (nicht gezeigt). Dieses ließ auf die Existenz eines anderen HABP-aktivierbaren Rezeptors schließen.

Auf der Suche nach dem verantwortlichen Rezeptor für das in HUVECs beobachtete HABP-induzierte Ca^{2+} -Signal, wurde in Folgeexperimenten untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen diesem Befund und der möglichen HABP-vermittelten Freisetzung von BK durch die Spaltung von Zelloberfläche-assoziiertem HK besteht. Da für BK aus der Literatur bekannt ist, dass es in Endothelzellen eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern hervorruft (FREAY *et al.*, 1989; BUSSE & FLEMING, 1996), war die Vermutung naheliegend, dass durch HABP freigesetztes BK die Ca^{2+} -Mobilisierung auslöst.

Aus Kostengründen wurde für die im Folgenden beschriebenen Messungen ein Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometer benutzt. Es hat den Vorteil, dass das Volumen für einen Versuchsansatz weniger als 1/10 des Volumens der zuvor verwendeten Küvetten beträgt und man gleichzeitig aufgrund der hohen Lesegeschwindigkeit des Gerätes bis zu zehn Versuchsansätze parallel messen kann. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Zellen nicht mehr auf Quartzobjektträgern herangezüchtet werden müssen sondern in normalen Zellkulturplatten im Mikrotiterformat wachsen können, wodurch die Anzahl der für einen Versuchsansatz notwendigen Zellen stark reduziert wird.

Die Auswertung der bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen ergab, dass die durch HABP induzierten Ca^{2+} -Signale im Vergleich zu Positivkontrollen wie z. B. Thrombin bei einer Vielzahl der Messungen sehr niedrig waren und die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur etwa 10-20 % der Signalstärke der in Abb. 2.1 gezeigten Messung betrugen. Es wurde daher vermutet, dass die Menge an spaltbarem HK auf der Zelloberfläche von HUVECs in vielen Fällen nicht ausreicht um den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels

nach Behandlung der Zellen mit HAPB beobachten zu können. Aufgrund dessen wurden die folgenden Messungen zur Ermittlung der $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von 20 nM HK im Inkubationspuffer durchgeführt. Da das Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometer für eine Messung mit Fura 2 aufgrund fehlender Filter nicht geeignet und eine alternierende Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängen nicht möglich war, wurde für die weiteren Messungen statt Fura 2 der Ca^{2+} -Indikator Fluo 3 verwendet. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 485 nm, während die Emission bei 538 nm gemessen wurde. HUVECs der 1., 2. oder 3. Passage wurden bis hin zur Konfluenz in Fibronectin-beschichteten 96-well-Zellkulturplatten in MCDB131 (+ 8 % FBS) herangezüchtet und wie oben beschrieben 1 h bei 37°C mit Fluo 3/AM und 0,025 % (w/v) Pluronic F-127 in HMTS beladen, gründlich gewaschen und nach Zugabe von 50 µL HMTS (+ 20 nM HK) in die Vertiefungen der Platte die Messung zur Bestimmung der Grundlinie gestartet. Nach Aufzeichnung einer stabilen Grundlinie als Referenz (nach ca. 150 s) wurden die Zellen durch Zugabe von 250 nM HAPB stimuliert. Der daraus resultierende Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels lag bei 200-250 nM (Abb. 2.2, A). Aufgrund der Zugabe von HK in den Inkubationspuffer konnte bei der Mehrheit der durchgeführten Messungen durch HAPB ein deutlicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ induziert werden, ähnlich, wie dies auch in den wenigen Fällen der zuvor ohne HK durchgeführten Experimente zu beobachten war. Die Reproduzierbarkeit konnte durch zahlreiche Messungen, die in einer ähnlichen Signalstärke resultierten, bewiesen werden. Dieses Ergebnis belegt, dass die Anwesenheit von HK Voraussetzung für die Induzierung des Ca^{2+} -Signals durch HAPB in HUVECs ist und die Aktivierung der Zellen damit HK- bzw. BK-abhängig ist.

Die Literatur beschreibt, dass BK unter physiologischen Bedingungen in HUVECs einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ über die Aktivierung des Bradykinin-Rezeptors B2 (B2R) auslöst (FREAY *et al.*, 1989; FLEMING *et al.*, 1995). Daher wurde im Folgenden überprüft, ob der endotheliale B2R das Signal für die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung vermittelt. Hierzu wurden die Zellen für 30 min mit 1 µM des B2R-Antagonisten HOE140 vorinkubiert und anschließend mit HAPB behandelt. Die HAPB-vermittelte Mobilisierung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen wurde dadurch vollständig unterdrückt (Abb. 2.2, B). Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass der B2R für die Weiterleitung des HAPB-induzierten Signals zur Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern verantwortlich ist.

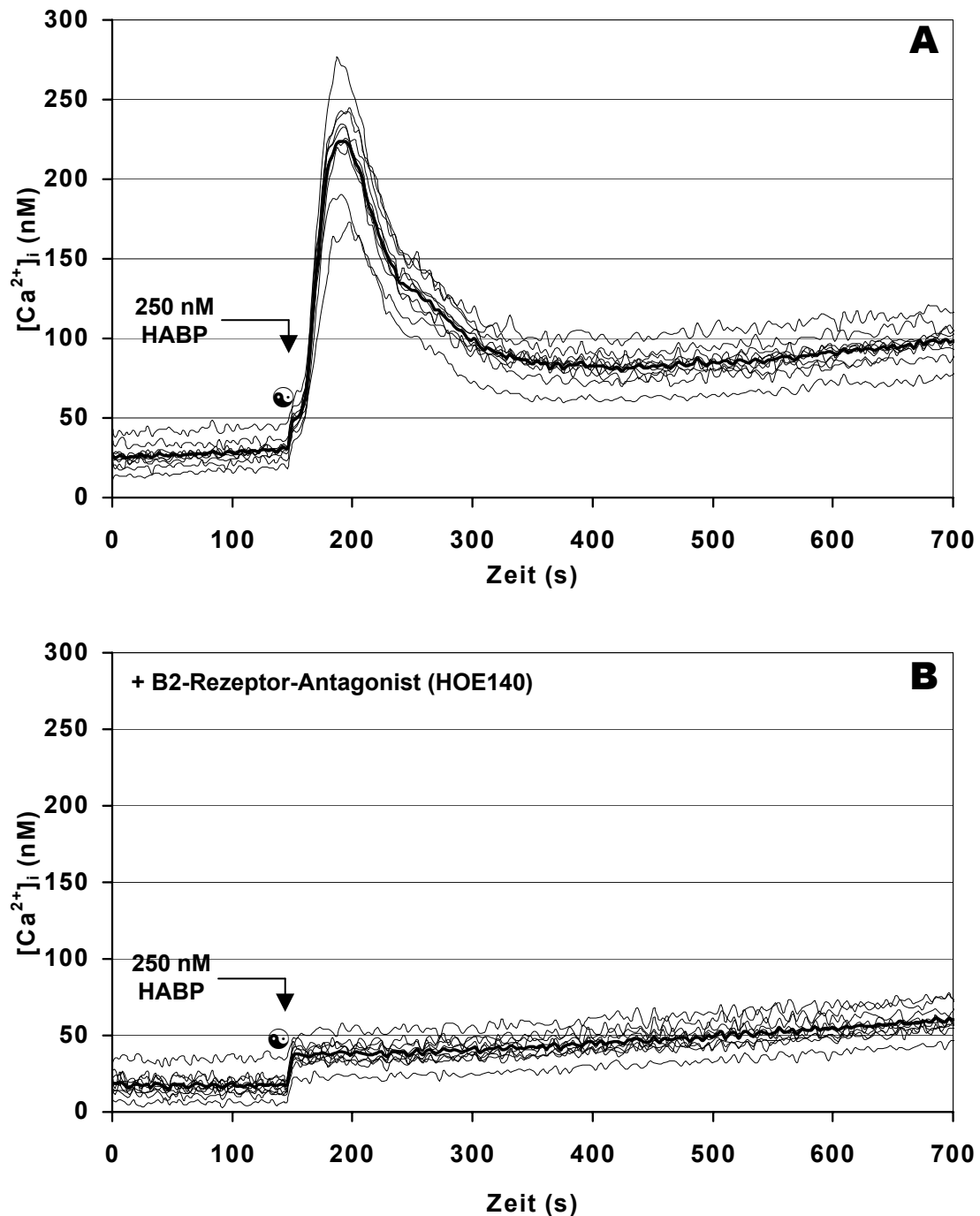


Abbildung 2.2: HABP löst in HUVECs in Abhängigkeit vom Bradykinin-Rezeptor B2 einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ aus. Konfluente HUVEC-Monolayer wurden für 1 h bei 37°C mit 5 μ M Fluo 3/AM und 0,025 % (w/v) Pluronic F-127 beladen und anschließend mit 250 nM HABP in Gegenwart von 20 nM HK im Inkubationspuffer stimuliert (**A** und **B**). Die Vorinkubation mit dem B2R-Antagonisten HOE140 (1 μ M) erfolgte für 30 min bei 37°C (**B**). Die dicke schwarze Kurve stellt die gemittelten Werte aus zehn Einzelmessungen (dünne schwarze Linien) dar. Die zum Zeitpunkt der Zugabe von HABP sichtbare Stufe (*) im Kurvenverlauf nach ca. 150 s kommt aufgrund des Volumenunterschiedes durch das Hinzupipettieren des Enzyms im Verhältnis 1:1 zum vorgelegten Puffer zustande und ist nicht als Teil des Signals zu interpretieren.

2.1.2 HABP setzt Bradykinin auf der Zelloberfläche von HUVECs frei

Die in Kapitel 2.1.1 dargestellten Untersuchungen zur HABP-induzierten Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern in HUVECs belegen, dass das beobachtete Signal vor allem von der Menge der auf der Zelloberfläche gebundenen bzw. im Zellüberstand in Lösung befindlichen HK-Moleküle abhängig ist. Durch die proteolytische Spaltung von HK durch HABP wird BK gebildet, welches die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in HUVECs über den B2R vermittelt. Dieses wurde durch Messungen in Gegenwart des B2R-Antagonisten HOE140 bestätigt, in denen das Signal vollständig gehemmt wurde. Davon ausgehend sollte die HABP-vermittelte Freisetzung von BK durch die Spaltung von Zelloberflächen-gebundenem HK im Überstand von HUVEC-Kulturen nachweisbar sein.

Zur Bestimmung der durch HABP freigesetzten BK-Menge im Zellüberstand wurde daher ein Radioimmunoassay (RIA) mit BK-spezifischen Antikörpern nach der Methode von FINK *et al.* (1985) durchgeführt. Hierzu wurden die konfluenten HUVEC-Monolayer für 0, 15 und 45 min in Anwesenheit oder Abwesenheit von 500 nM HABP in HMTS bei 37°C inkubiert. Da BK unter physiologischen Bedingungen sehr geringe Lebensdauer besitzt ($t_{1/2} = 15\text{-}30$ s) und sehr schnell durch das plasmatische *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) inaktiviert und abgebaut wird (YANG *et al.*, 1971), wurde dem Inkubationsansatz der ACE-Inhibitor Captopril zugesetzt. Die Zugabe von HOE140 sollte eine Bindung der freigesetzten BK-Moleküle an den B2R unterbinden, um die Diffusion möglichst vieler BK-Moleküle in den Überstand zu ermöglichen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand jedes Ansatzes mit Hilfe einer Ethanol-Fällung von den hochmolekularen Proteinen (HK, HKa) befreit. Dieses sollte gewährleisten, dass in den Proben keine Kinin-haltigen Kininogen-Moleküle mehr nachzuweisen waren, deren BK-Sequenzabschnitte in der Domäne 4 (siehe Abb. 1.5) im RIA von den BK-Antikörpern erkannt werden könnten und das Ergebnis verfälschen würden. Der Ethanol-Überstand mit den niedrigmolekularen Proteinen wurde anschließend in einem Vakuum-Konzentrator eingedampft und die Menge der freien BK-Moleküle in den Proben im RIA bestimmt.

Ausgehend von der im RIA ermittelten Gesamtmenge an BK-Molekülen in den einzelnen Proben und einem Molekulargewicht von 1060 g/mol für BK wurde über die Masse die BK-Konzentration in 4 mL Zellkulturüberstand berechnet.

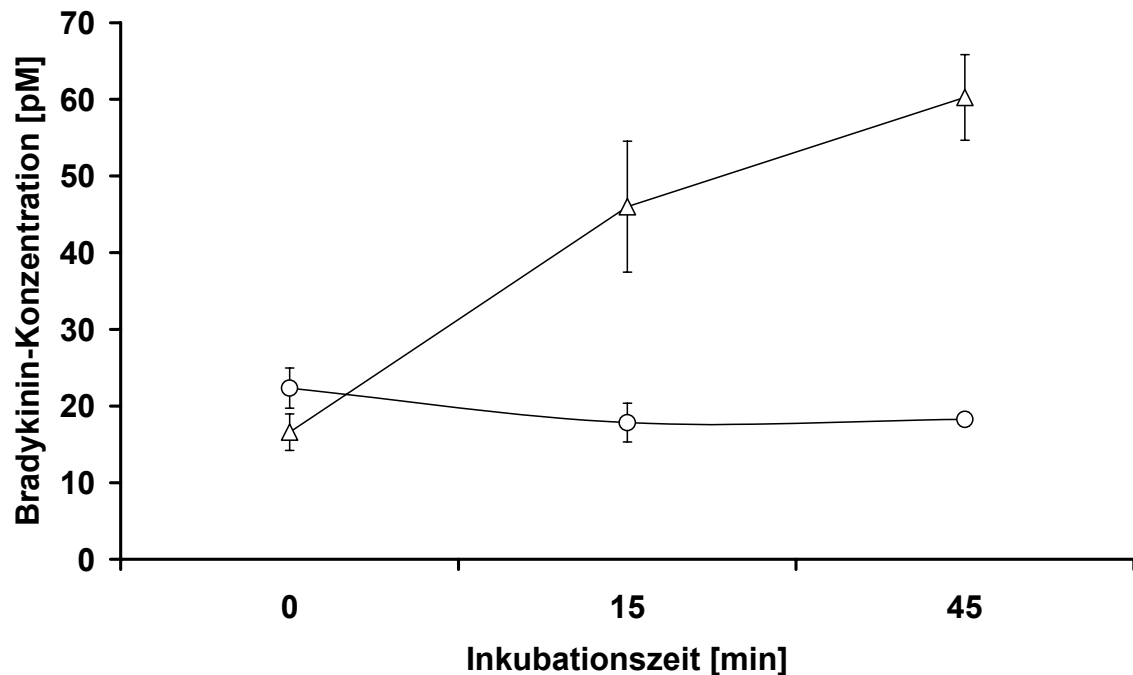


Abbildung 2.3: HAPB-vermittelte Bradykinin-Freisetzung auf der Zelloberfläche von HUVECs. Ein konfluenter HUVEC-Monolayer (175 cm²-Zellkulturflasche) wurde gewaschen und in Anwesenheit (△) oder Abwesenheit (○) von 500 nM HAPB für 0, 15 und 45 min inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend mittels Ethanol-Präzipitation gefällt und der Ethanol-Überstand im Vakuum-Konzentrator eingedampft. Die in den Proben entstandene Menge an BK-Molekülen wurde in einem quantitativen Radioimmunoassay analysiert. Ausgehend von der Gesamtmenge der BK-Moleküle und einem Molekulargewicht von 1060 g/mol für BK wurde über die Masse die BK-Konzentration in 4 mL Zellkulturüberstand berechnet. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n = 2 Messungen (Doppelwertbestimmung).

Die in Abb. 2.3 graphisch dargestellten Ergebnisse des RIAs zum Nachweis von freiem BK im Zellkulturüberstand von HUVECs weisen eine deutliche BK-Freisetzung in den HAPB-inkubierten Untersuchungsansätzen auf. Im Vergleich zu den mit Puffer behandelten Kontrollansätzen, die im Bereich von 16-22 pM freigesetztem BK liegen, kann nach 15 min Inkubation mit HAPB eine Zunahme der BK-Konzentration im Überstand auf ~ 46 pM verzeichnet werden. Nach 45 min Inkubationszeit erhöht sich die Menge der BK-Freisetzung im Vergleich zum Kontrollwert auf 60 pM.

Die Resultate des RIAs beweisen, dass HAPB auf der Zelloberfläche von HUVECs durch die proteolytische Spaltung von zellgebundenen HK-Molekülen BK freisetzt. Da jedoch erst nach sehr langer Inkubationszeit von 15-45 min eine signifikante Erhöhung der BK-Konzentration im Überstand zu messen ist, bleibt fraglich, ob freigesetztes BK direkt in den Überstand abgegeben wird oder möglicherweise ein Großteil der Moleküle in der Nähe des Wirkungsortes an der Zelloberfläche gebunden bleibt. Zudem bleibt die Frage, ob innerhalb der ersten Minute nach HAPB-Stimulation ausreichende Mengen an BK

freigesetzt werden, die die oben beschriebenen Aktivierungsvorgänge induzieren können. In Vorversuchen mit kürzeren Inkubationszeiten (0, 1, 5 min) wurde keine Änderung der BK-Konzentration im Zellüberstand im RIA gemessen. Da die beobachteten Ca^{2+} -Signale innerhalb der ersten Minute nach HABP-Inkubation induziert werden, können die RIA-Ergebnisse keinen konkreten Nachweis dafür erbringen, dass in dieser Zeit BK freigesetzt wird, welches anschließend den B2R aktivieren kann. Somit erscheint auch erklärbar, dass erst die Zugabe von exogenem HK bei den Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dazu geführt hat, regelmäßig reproduzierbare Signale messen zu können. Grundsätzlich erbringen die aus dem RIA resultierenden Daten jedoch den Beweis dafür, dass HABP zellgebundene HK-Moleküle spalten und dabei BK freisetzen kann, dieses aber erst nach einer Inkubationszeit von 15-45 min nachweisbar ist.

Nach den Daten verschiedener Arbeitsgruppen, die in den letzten Jahren bezüglich endothelialer HK-Bindestellen publiziert wurden, kann man davon ausgehen, dass zwischen 10^5 und 10^7 HK-Moleküle auf einer Endothelzelle gebunden werden können (HASAN *et al.*, 1995; SCHMAIER, 2000; BAIRD & WALSH, 2003). Werden alle diese Moleküle durch HABP proteolytisch gespalten und dabei BK freigesetzt, wären theoretisch ebenso viele BK-Moleküle auf der Zelloberfläche bzw. im Überstand nachweisbar, was einer Konzentration von maximal ca. 60 nM freien BK-Molekülen entspricht. Für die Aktivierung des B2R reichen bereits 3 nM BK aus (BUSSE & LAMONTAGNE, 1991), was auch in Messungen mit der eigenen HUVEC-Zelllinie überprüft wurde. Dies entspricht einer Konzentration, die 50-1000fach über der im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen ermittelten Konzentration an freien BK-Molekülen liegt.

2.1.3 Aktivierung des MAPK-Signalweges durch HABP in HUVECs

Die Literatur beschreibt, dass die Aktivierung von HUVECs durch BK zur Initiation verschiedener Signaltransduktionsmechanismen führt. Zum einen wird über die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten B2R und der darauf folgenden Aktivierung der Phospholipase C (PLC) eine vermehrte Synthese von Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3) ausgelöst, die schließlich zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt. Zum anderen ist mit der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Speichern eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinases*) in Form einer Phosphorylierung verbunden (FREAY *et al.*, 1989; FLEMING *et al.*, 1995; BUSSE & FLEMING, 1996). Die ERK1/2-abhängige MAPK-Signalkaskade kann durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli und

deren Rezeptor-Wechselwirkungen ausgelöst werden. Die MAPKs nehmen bei der Regulation essentieller zellulärer Funktionen wie Zellproliferation und -differenzierung eine Schlüsselrolle ein und gehören damit zu den wichtigsten Enzymen, die für die Signalweiterleitung in eukaryotischen Zellen verantwortlich sind. Um Zellen zum Wachstum oder zur Differenzierung anzuregen, muß das Signal vom membranständigen Rezeptor zum Zellkern weitergeleitet werden. Hierfür scheinen mehrfach in Serie geschaltete Kaskaden von Phosphorylierungsschritten ein besonders geeignetes Übertragungssystem darzustellen. Abb. 2.4 veranschaulicht den klassischen Aufbau einer MAPK-Kaskade am Beispiel des ERK1/2-Signalweges.

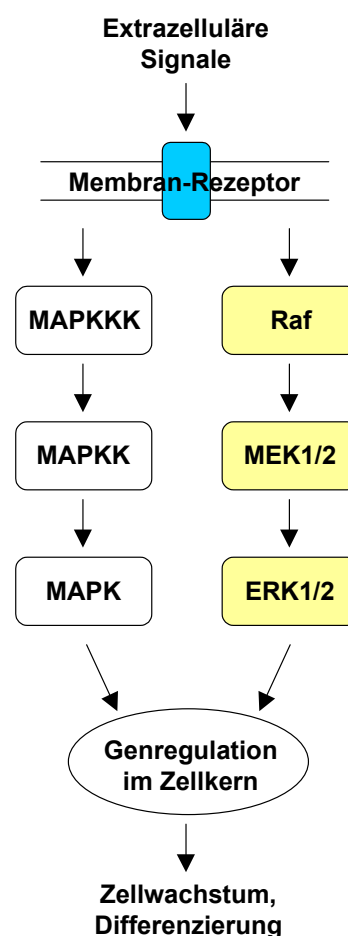


Abbildung 2.4: Klassischer Aufbau einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade am Beispiel von ERK1/2. Die zweifach-spezifische Phosphorylierung am Threonin- und Tyrosinrest im Phosphorylierungsmotiv T-E-Y führt zur vollständigen Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2. Als MAPK-Aktivatoren fungieren dabei die MAPK-Kinasen (MAPKK) MEK1/2, die ihrerseits durch MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) wie z. B. Raf stimuliert werden. Je nach Lokalisation, Verlauf und Höhe der MAPK-Aktivität phosphorylieren ERK1/2 cytosolische und/oder nukleäre Substrate und beeinflussen so die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Die weiß hinterlegten Kästchen kennzeichnen die allgemeinen Bezeichnungen der Komponenten einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade. Die Namen der am ERK1/2-Signalweg beteiligten Proteinkinasen sind durch die gelb gefärbten Kästchen hervorgehoben.

Die Aktivierung der MAPKs erfolgt durch Phosphorylierung des konservierten T-E-Y-Motivs (T-E-Y = Threonin-Glutamat-Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv), einem Threonin- und einem Tyrosinrest, auf der MAPK-Aktivierungsschleife. Der MAPK-Aktivator, der beide Phosphorylierungen katalysiert, ist die so genannte MAPK-Kinase (MAPKK oder MEK), die ihrerseits durch eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK, z. B. Raf) stimuliert wird. Nach der Aktivierung dieser Signalkaskade leiten die Kinasen ERK1/2 das Signal weiter, indem sie cytoplasmatische Substrate (cytoskelettale Proteine, u. a.) oder, nach Translokation in den Zellkern, genregulatorische Proteine (Transkriptionsfaktoren) phosphorylieren.

2.1.3.1 Die HAPB-vermittelte ERK1/2-Aktivierung ist unabhängig vom B2-Rezeptor

Ob HAPB in HUVECs neben der Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen über den B2R auch eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (p44/42) induzieren kann, wurde in den folgenden Experimenten anhand der Überprüfung des Phosphorylierungszustandes von ERK1/2 ermittelt. Hierzu wurden konfluente HUVECs für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert um die Zellen vorübergehend in einen ruhenden Zustand zu versetzen und das Basalniveau phosphorylierter Proteine, die in Signaltransduktionsmechanismen involviert sind, möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden anschließend mit 125 nM HAPB für 15 min bei 37°C stimuliert und das Zelllysate nach erfolgter SDS-PAGE im Western Blot auf phosphoryliertes ERK1/2 hin analysiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurden dieselben Proben auch einem Nachweis auf die p44/42 MAPK-Gesamtmenge unterzogen, wobei ein Antikörper gegen die nicht-aktivierte Form von ERK1/2 verwendet wurde (nicht gezeigt). Die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde auch in allen in den folgenden Kapiteln beschriebenen Western Blot-Analysen anhand dieser Nachweismethode sichergestellt.

Abb. 2.5 (Spur 2) veranschaulicht, dass die Inkubation von HUVECs mit HAPB im Vergleich zur Kontrolle (Spur 1) zu einer deutlichen Phosphorylierung von p44/42 führte. Ein Folgeexperiment in Gegenwart des B2R-Antagonisten HOE140 sollte Aufschluss darüber geben, ob die Phosphorylierung von ERK1/2 über BK und den B2R vermittelt wird. Interessanterweise hatte die 30-minütige Vorbehandlung der Zellen mit 1 μM HOE140 (Spur 3+4) keinen Einfluß auf die Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42. Zur Überprüfung der Funktionalität von HOE140 wurden die Zellen in Vorversuchen in Gegenwart des B2R-Antagonisten (1 μM) mit 10 nM BK stimuliert, wodurch die Aktivierung von p44/42 unterdrückt wurde. Da die Auswertung der Experimente zur

Messung der $[Ca^{2+}]_i$ ergab, dass die Mengen an Zelloberflächen-gebundenen HK-Molekülen bei einer Vielzahl der verwendeten Zellkulturen nicht ausreicht, wurden auch die hier dargestellten Stimulationsversuche zusätzlich in Gegenwart von exogenem HK (20 nM) durchgeführt, wodurch sich das Ergebnis jedoch nicht veränderte. Somit verläuft die durch HABP vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalweges in HUVECs unabhängig vom B2R und damit auch unabhängig von BK, welches durch die Protease freigesetzt wurde. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen BK-induzierten Signaltransduktion in HUVECs induziert HABP nur die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels über die BK-Freisetzung (aus Zelloberflächen-assoziiertem oder exogenem HK) und den B2R, die Aktivierung von ERK1/2 wird jedoch von einem anderen, unbekannten Rezeptor vermittelt. Dieses läßt auf eine Aktivierung von HUVECs durch HABP über zwei verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege schließen.

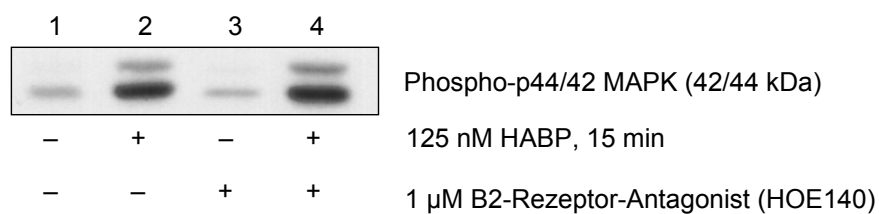


Abbildung 2.5: HABP aktiviert in HUVECs die MAP-Kinasen ERK1/2 (p44/42) unabhängig vom B2-Rezeptor. Konfluente HUVECs wurden für 24 h serumfrei kultiviert und für 15 min mit 125 nM HABP inkubiert. Die Vorinkubation mit 1 µM des B2R-Antagonisten HOE140 erfolgte für 30 min. Nach der Stimulation wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert und einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen. Es wurde die phosphorylierte, aktivierte Form der MAP-Kinase p44/42 detektiert. Das Molekulargewicht ist angegeben.

2.1.3.2 Die ERK1/2-Phosphorylierung ist Pertussis- und Cholera-toxin-insensitiv

Der B2R gehört zur Familie der GPCRs und besitzt ein G-Protein vom $G\alpha_q$ -Subtyp (GUTOWSKI *et al.*, 1991), welches nach der Rezeptoraktivierung die PLC oder das $G\alpha_i$ -Protein aktiviert (LIAO & HOMCY, 1993). Obwohl die in Kap. 2.1.3.1 dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass der B2R für die Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 nicht verantwortlich ist, sollte dennoch untersucht werden, ob Pertussis- und Cholera-toxin-sensitive G-Proteine ($G\alpha_i$ und $G\alpha_s$) an der HABP-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Durch den Einsatz von Pertussistoxin wird das $G\alpha_i$ -Protein inhibiert, Cholera-toxin hingegen reguliert die Aktivität des $G\alpha_s$ -Proteins herunter. Ruhende HUVECs wurden mit 5 µg/mL Cholera-toxin oder 100 ng/mL Pertussistoxin für 24 h vorinkubiert und anschließend für 15 min mit HABP stimuliert. Die für eine Inhibition notwendigen

Konzentrationen für Cholera- und Pertussistoxin wurden der Literatur entnommen (CHRISTOPHER *et al.*, 2001). Die Western Blot-Analyse (Abb. 2.6) belegt, dass HABP die Phosphorylierung von p44/42 in HUVECs über einen Pertussis- und Cholera-toxin-insensitiven Mechanismus induziert (Spur 4 u. 8). Die Beteiligung $G\alpha_s$ - oder $G\alpha_i$ -Proteingekoppelter Rezeptoren an der HABP-vermittelten p44/42 MAPK-Aktivierung kann aufgrund dieser Resultate ausgeschlossen werden.

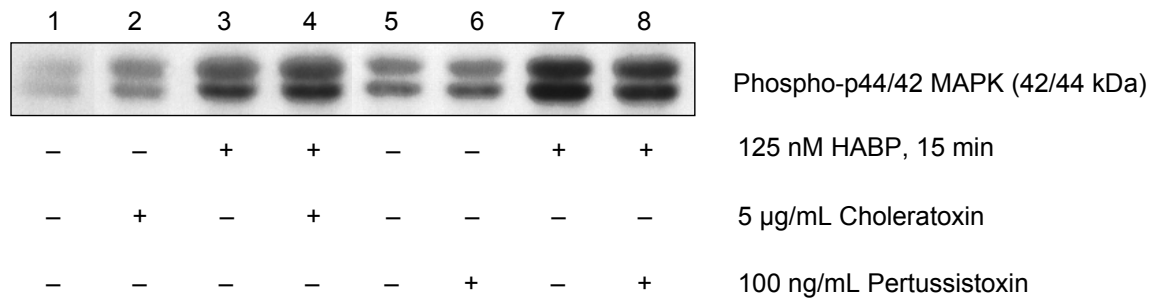


Abbildung 2.6: HABP induziert die ERK1/2-Phosphorylierung in HUVECs über einen Pertussis- und Cholera-toxin-insensitiven Mechanismus. Ruhende Zellen wurden für 24 h mit Pertussistoxin (100 ng/mL) oder Cholera-toxin (5 µg/mL) vorinkubiert und anschließend für 15 min mit 125 nM HABP stimuliert. Die Zelllysate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.1.3.3 Das MAPK-Signal ist unabhängig von intra- bzw. extrazellulären Ca^{2+} -Ionen

Wie in Kap. 2.1.1 dargestellt, löst HABP in HUVECs einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ aus. Um herauszufinden, ob dieser in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 steht, wurden ruhende HUVECs mit 50 µM des membrangängigen, intrazellulären Calcium-Komplexbildners EGTA-AM für 30 min vorinkubiert und mit 125 nM HABP für 15 min stimuliert. Wie aus Abb. 2.7 hervorgeht, hat die Komplexbildung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen durch EGTA-AM keinen Einfluß auf das MAPK-Signal (Spur 8). Auch durch eine Vorbehandlung der Zellen mit 100 µM EGTA wurde das Signal nicht verändert (Spur 4). Die Phosphorylierung von ERK1/2 verläuft demnach über einen Mechanismus, der sowohl von intrazellulären als auch von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen unabhängig ist.

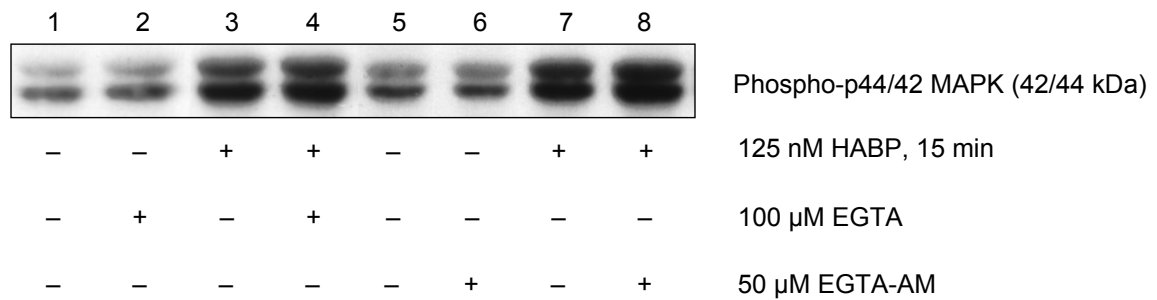


Abbildung 2.7: Die Phosphorylierung von p44/42 MAPK ist unabhängig von intrazellulären und extrazellulären Ca^{2+} -Ionen. Die ruhenden Zellen wurden mit 50 µM EGTA-AM bzw. 100 µM EGTA für 30 min vorinkubiert und anschließend für 15 min mit 125 nM HABP stimuliert. Der Phosphorylierungs-Nachweis wurde wie in Kap. 2.1.3.1 dargestellt durchgeführt.

2.1.3.4 Die ERK1/2-Aktivierung ist abhängig von der enzymatischen Aktivität

Um die Relevanz der enzymatischen Aktivität der Plasmaprotease HABP für die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 zu ermitteln, wurde das Enzym durch Vorinkubation mit einem 10fachen Überschuss Aprotinin, einem unspezifischen, aber sehr effizienten, Serinprotease-Inhibitor aus Rinderpankreas, oder einem 50fachen Überschuss PPACK, einem synthetischen Peptidchloromethylketon, inhibiert. In einem weiteren Ansatz wurde HABP durch Inkubation bei 95°C durch Hitzeeinwirkung inaktiviert. Die Inkubation der Zellen mit inaktivierter Protease zeigte in allen drei Fällen, dass keine Phosphorylierung von p44/42 MAPK stattfindet. Nur der Einsatz des proteolytisch aktiven Enzyms führte zu einer Aktivierung von ERK1/2.

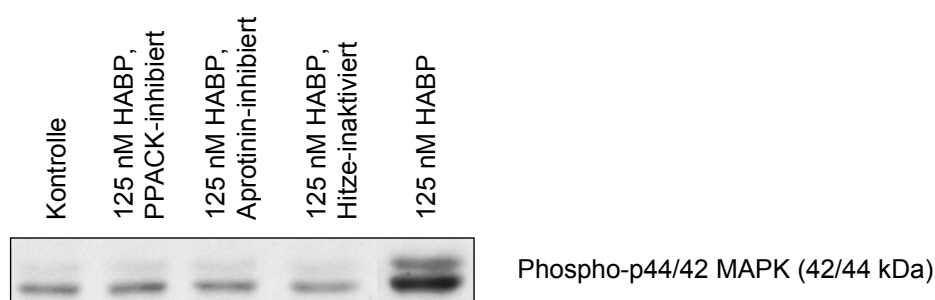


Abbildung 2.8: Die enzymatische Aktivität von HABP ist für die ERK1/2-Aktivierung notwendig. Serumfreie HUVECs wurden für 15 min mit PPACK-, Aprotinin- und Hitze-inaktivierter Protease inkubiert. Die Positivkontrolle wurde mit dem aktiven Enzym durchgeführt. Der Nachweis der p44/42 MAPK-Phosphorylierung erfolgte wie in Kap. 2.1.3.1 beschrieben.

2.1.3.5 Die HABP-induzierte p44/42 MAPK-Aktivierung ist konzentrationsabhängig

Des Weiteren wurde die Konzentrationsabhängigkeit der HABP-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 überprüft. Hierzu wurden die Endothelzellen mit einer geometrischen Konzentrationsreihe HABP (4 nM bis 250 nM) stimuliert und die Zelllysate im Western Blot analysiert. Schon bei Konzentrationen von 16 und 31 nM HABP war eine Phosphorylierung von p44/42 in HUVEC-Zelllysaten nachzuweisen (Abb. 2.9). Eine vollständige Aktivierung konnte mit 63 und 125 nM HABP erreicht werden. Für die meisten im Rahmen dieser Studien durchgeführten Stimulationsversuche wurde daher eine HABP-Konzentration von 125 nM gewählt.

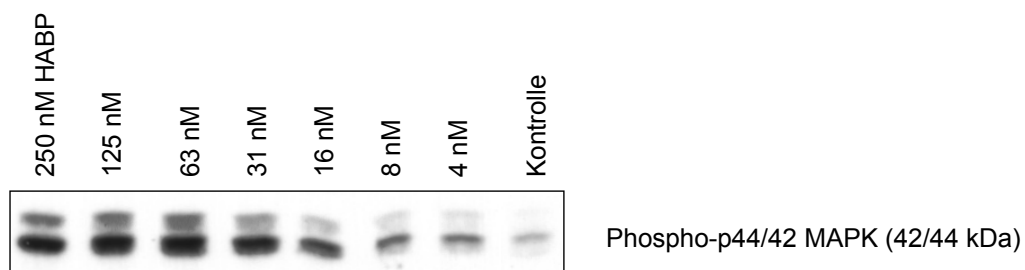


Abbildung 2.9: Konzentrationsabhängige Aktivierung von p44/42 MAPK durch HABP. Ruhende HUVECs wurden mit 0, 4, 8, 16, 31, 63, 125 und 250 nM HABP für 15 Minuten stimuliert und die Zelllysate anschließend mit phosphospezifischen p44/42 MAPK-Antikörpern analysiert.

2.1.3.6 Zeitabhängige Aktivierung der Proteinkinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2

MAPK-Signalkaskaden sind in 3-Stufen-Modulen organisiert, die aus sich sequentiell phosphorylierenden Kinasen bestehen, deren Aktivierungsreihenfolge genau definiert ist. Zu den Komponenten des ERK1/2-Signalweges gehören außer ERK1/2 selbst die Proteinkinasen MEK1/2 und Raf (a-Raf, b-Raf, c-Raf). Die Induktion dieser Kinase-Kaskade geht von Ras aus, einem intrazellulären GTPase-Schaltprotein, das die Signalübertragung vom aktivierten Rezeptor zur MAPK-Kaskade vermittelt. Aktiviertes Ras leitet die Signale über die hochkonservierte Kaskade von Proteinkinasen wie folgt weiter: Die von Ras ausgehenden Signale werden zunächst von der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinase Raf übernommen und dann auf MEK1/2 und schließlich auf p44/42 MAPK übertragen.

Um zu überprüfen, ob im Zuge der HABP-induzierten ERK1/2-Aktivierung ebenso eine Phosphorylierung der „stromaufwärts“ liegenden Proteinkinasen MEK1/2 und Raf (c-Raf) nachzuweisen ist, wurden diese mit phosphospezifischen Antikörpern in HABP-induzierten Proben detektiert. Wie aus Abb. 2.10 hervorgeht, werden außer ERK1/2 auch

MEK1/2 und Raf (etwas schwächer) durch die Stimulierung von HUVECs mit 125 nM HABP zeitabhängig aktiviert. Die Aktivierung der drei Proteinkinasen verläuft transient und erreicht ein Aktivierungsmaximum nach 10-20 min Inkubationszeit.

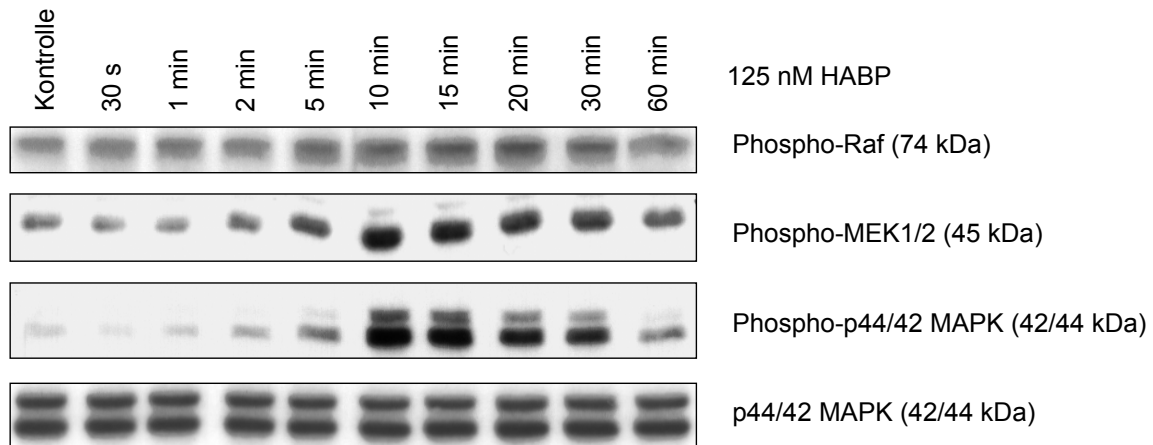


Abbildung 2.10: Die Proteinkinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2 werden nach HABP-Stimulation in HUVECs zeitabhängig aktiviert. Ruhende, serumfreie HUVECs wurden für 0, 30 s, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min mit 125 nM HABP stimuliert und die erhaltenen Proben im Western Blot analysiert. Raf, MEK1/2 und ERK1/2 wurden mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die p44/42-Gesamtmenge in den Proben wurde mit einem Antikörper gegen die nicht-aktivierte Form des Proteins nachgewiesen.

Den Beweis der Abhängigkeit der beobachteten Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 von der in der MAPK-Signalkaskade „stromaufwärts“ liegenden Proteinkinase MEK1/2 erbrachten Experimente in Anwesenheit des MEK1/2-Inhibitors U0126. Die Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M U0126 vorinkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit HABP stimuliert. Die Phosphorylierung von p44/42 MAPK wird durch den eingesetzten Inhibitor vollständig unterbunden (Abb. 2.11). Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse beweisen, dass durch die Behandlung von HUVECs mit HABP der klassische MAPK-Signalweg über Raf, MEK1/2 und ERK1/2 aktiviert wird und eine Aktivierung der Proteinkinasen p44/42 MAPK durch eine andere, möglicherweise noch unbekannte Kinase, ausgeschlossen werden kann.

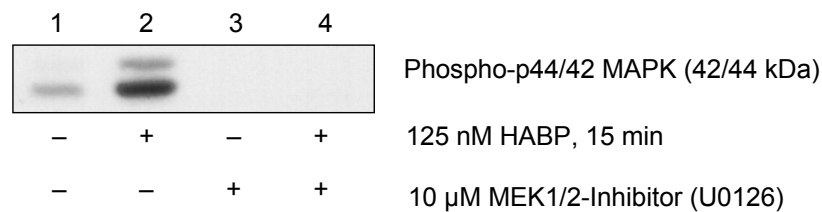


Abbildung 2.11: Der MEK1/2-Inhibitor U0126 hemmt die Phosphorylierung von ERK1/2. Konfluente, serumfreie HUVECs wurden mit 10 μM U0126 für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 125 nM HABP für 15 min stimuliert. Der Nachweis von Phospho-p44/42 MAPK wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.1.3.7 Der FGF-Rezeptor 1 vermittelt die Aktivierung von ERK1/2

In Endothelzellen wird der ERK1/2-Signaltransduktionsweg zu einem großen Teil durch die Wechselwirkung von Gefäßwachstumsfaktoren und Cytokinen mit ihren extrazellulären Rezeptoren aktiviert und leitet auf diese Weise wachstumsfördernde Signale zum Zellkern weiter. Der für die Entwicklung von Endothelzellen essentiellste Wachstumsfaktor ist der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF). In HUVECs interagiert bFGF mit seinem Rezeptor FGFR1 und vermittelt so Signale ins Zellinnere, die während der Angiogenese und Wundheilung die Abläufe der Gefäßzellinvasion, Migration, Proliferation und Differenzierung steuern. Parallel zu dieser Arbeit wurden in der eigenen Arbeitsgruppe Studien durchgeführt, in denen der Einfluß von HABP auf die Zelladhäsion und -proliferation von HUVECs und humanen Lungenfibroblasten (MRC-5) untersucht wurde. Aus ihnen geht hervor, dass HABP sowohl die Adhäsion als auch die Proliferation dieser Zelllinien wesentlich beeinflusst (ETSCHEID *et al.*, 2002c; ETSCHEID *et al.*, 2004). Aus diesem Grunde wurde überprüft, ob HABP in diesem Zusammenhang möglicherweise einen Einfluß auf die Wachstumsfaktorrezeptor-vermittelte Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges ausübt. Der bFGF-aktivierbare Signalweg über den FGFR1 stellt in Endothelzellen den wichtigsten Wachstumsfaktorrezeptor-vermittelten Signalweg dar. Zur Untersuchung des FGFR1-vermittelten ERK1/2-abhängigen Signalweges in HUVECs wurde der FGFR1 mit dem spezifischen Inhibitor SU5402 (35,7 μM) inhibiert und die Zellen anschließend mit 125 nM HABP für 15 min stimuliert. Der FGFR1-Inhibitor SU5402 ist ein synthetischer Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor auf Indolidon-Basis, der die Kinase-Aktivität des FGFR1 durch Bindung der ATP-Bindestelle in der cytoplasmatischen Domäne hemmt. Interessanterweise wurde das durch HABP ausgelöste Phosphorylierungssignal in Gegenwart des FGFR1-Inhibitors im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vollständig unterdrückt, wie aus der Western Blot-Analyse mit phosphospezifischen p44/42 MAPK-Antikörpern hervorging (Abb. 2.12).

Dieses Resultat belegt, dass die HABP-induzierte ERK1/2-Aktivierung in HUVECs durch den Wachstumsfaktorrezeptor FGFR1 vermittelt wird und dass daher neben dem B2R-vermittelten Signalweg über die Freisetzung von BK ein weiterer Signalweg existiert.

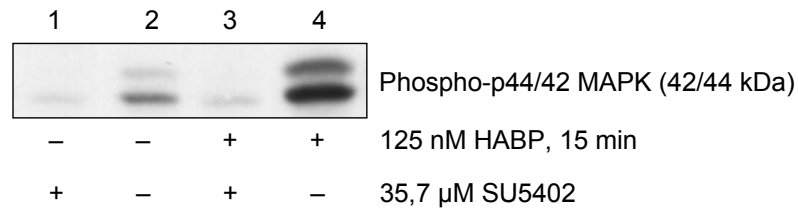


Abbildung 2.12: Der FGFR1-Inhibitor SU5402 unterdrückt die HABP-induzierte Aktivierung von ERK1/2 in HUVECs. Serumfreie Endothelzellen wurden für 30 min mit dem FGFR1-Inhibitor SU5402 (35,7 µM) vorinkubiert und für 15 min mit 125 nM HABP stimuliert. Der Nachweis von Phospho-p44/42 MAPK wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt.

Im weiteren Verlauf der Studien wurde auch eine direkte Aktivierung (Phosphorylierung) des FGFR1 durch HABP überprüft. HUVEC-Zelllysate, die zuvor in einer Zeitreihe mit HABP behandelt worden waren, wurden im Western Blot auf Phospho-FGFR1 hin untersucht. Der Antikörpernachweis zeigte eine leichte Aktivierung der Rezeptormoleküle. Zur Kontrolle wurde auch die Gesamtmenge an FGFR1 mit einem Antikörper gegen die nicht-aktivierte Form detektiert. Da jedoch sowohl die aktivierten als auch die nicht-aktivierten Rezeptormoleküle im Western Blot nur sehr schwach nachweisbar waren, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch keine schlüssige Aussage darüber getroffen werden, ob der FGFR1 infolge einer direkten HABP-Stimulation aktiviert wird (Daten nicht gezeigt).

2.1.3.8 FGF-Antikörper neutralisieren die FGFR1-vermittelte ERK1/2-Aktivierung

Das in Kapitel 2.1.3.7 beschriebene Ergebnis, dass das HABP-induzierte ERK1/2-Signal durch den FGFR1 vermittelt wird und durch dessen spezifischen Inhibitor unterdrückt werden kann, läßt die Frage aufkommen, welcher Aktivierungsmechanismus der Aktivierung des ERK1/2-Signalweges zugrunde liegt. Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, welche die Aktivierung des FGFR1 auslösen können. Einerseits könnte HABP den Rezeptor direkt aktivieren. Da es in der Literatur jedoch bisher noch keine Angaben zur Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptor durch Proteasen gibt, wurde dieser Punkt für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Andererseits könnte FGF als sekundärer Auslöser den FGFR1 aktivieren. Weiterhin besteht aber auch die Möglichkeit, dass der FGFR1 über eine Transaktivierung durch einen anderen,

unbekannten HABP-aktivierbaren Rezeptor aktiviert wird. Um zu überprüfen, welche Bedeutung FGF bei der HABP-induzierten ERK1/2-Aktivierung zukommt, wurden die Zellen mit aFGF- und bFGF-neutralisierenden Antikörpern (je 100 µg/mL) vorinkubiert und anschließend mit 125 nM HABP für 15 min stimuliert. Sowohl aFGF (saurer FGF) als auch bFGF (basischer FGF) können in HUVECs über die Aktivierung des FGFR1 den ERK1/2-Signalweg auslösen und spielen eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Entwicklung von Endothelzellen. Eine proangiogene Wirkung besitzt jedoch nur bFGF. Aus diesem Grunde wurden beide Wachstumsfaktoren in diesem Experiment berücksichtigt. Sowohl der neutralisierende aFGF-Antikörper (A, Spur 1) als auch der neutralisierende bFGF-Antikörper (B, Spur 1) unterdrücken das durch HABP ausgelöste ERK1/2-Signal, wie aus dem in Abb. 2.13 dargestellten Western Blot hervorgeht. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Aktivierung der MAP-Kinase p44/42 möglicherweise durch aFGF und/oder bFGF als sekundäres Signal ausgelöst wird und HABP die Rolle eines Effektors einnimmt, der die Freisetzung des Wachstumsfaktors auf der Zelloberfläche induziert.

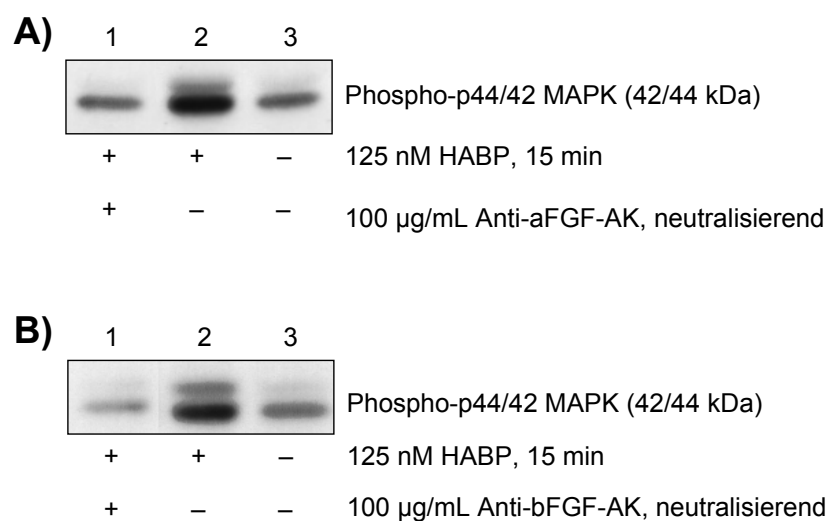


Abbildung 2.13: aFGF- und bFGF-Antikörper neutralisieren die HABP-induzierte p44/42 MAPK-Aktivierung. Ruhende HUVECs wurden mit jeweils 100 µg/mL aFGF- (A) bzw. b-FGF-neutralisierenden Antikörpern (B) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 125 nM HABP für 15 min stimuliert. Der Nachweis von Phospho-p44/42 MAPK wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Die in diesem Kapitel dargestellten Neutralisierungs-Experimente weisen darauf hin, dass das HABP-induzierte ERK1/2-Signal am FGFR1 durch FGF-Moleküle ausgelöst wird. Im Folgenden sollte dennoch überprüft werden, ob die Möglichkeit einer Transaktivierung des FGFR1 durch einen anderen unbekannten HABP-aktivierbaren Rezeptor

ausgeschlossen werden kann. Da der FGFR1-Inhibitor SU5402 an die ATP-Bindestelle der cytoplasmatischen Rezeptor-Domäne bindet und damit die infolge einer Rezeptoraktivierung stattfindende Autophosphorylierung an dieser Stelle unterbindet, ganz gleich, ob das Signal extrazellulär durch einen Liganden, oder intrazellulär durch Transaktivierung vermittelt wird, konnte er bei der Klärung dieser Frage nicht weiterhelfen. Zusätzliche Hinweise auf den möglichen Aktivierungsmechanismus sollte ein Rezeptor-Antagonist erbringen, der die Liganden-Bindestelle des Rezeptors auf der extrazellulären Seite blockiert. Im Falle einer Transaktivierung müsste auch in Gegenwart des Antagonisten auf der cytoplasmatischen Domäne des FGFR1 eine Signalweiterleitung erfolgen, die zur ERK1/2-Phosphorylierung führt. Experimente mit einem kommerziell erhältlichen FGFR1-Antagonisten, einem synthetischen Peptid aus der Sequenz des bFGF-Moleküls, konnten jedoch nicht ausgewertet werden, da der Antagonist nicht funktionsfähig war und auch in Kontrollexperimenten die mit bFGF induzierte Aktivierung von ERK1/2 nicht inhibierte (Daten nicht gezeigt). In weiterführenden Studien könnte das Austesten anderer FGFR1-Antagonisten der Klärung dieser Frage dienen.

2.1.3.9 Vergleich der FGF- und HAPB-induzierten ERK1/2-Signalstärken

Ausgehend von der Hypothese, dass die HAPB-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in HUVECs über die Freisetzung von FGF-Molekülen aus Reservoirs der extrazellulären Matrix (ECM) und die anschließende Aktivierung des FGFR1 verläuft, war ein Vergleich der mit aFGF und bFGF induzierten Signalstärke mit dem HAPB-abhängigen Signal von Interesse. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe aFGF und bFGF (4,8 pg/mL bis 2,5 ng/mL) sowie zum Vergleich mit 125 nM HAPB stimuliert. Zuvor wurde das Phosphorylierungsmaximum von ERK1/2 für aFGF und bFGF in einer Zeitreihe bestimmt. Es liegt bei 10 min nach Beginn der Stimulation (nicht gezeigt). Die Inkubation mit HAPB wurde wie in den vorhergehenden Versuchen für 15 min durchgeführt. Die in Abb. 2.14 dargestellten Ergebnisse dieses Experimentes veranschaulichen, dass das mit HAPB erzielte ERK1/2-Signal im Vergleich zu den aFGF- und bFGF-induzierten Signalen sehr schwach ist. Die Signalstärke der HAPB-vermittelten ERK1/2-Aktivierung entspricht einer Signalstärke, die man mit ~ 0,15 ng/mL aFGF oder ~ 0,3-0,6 ng/mL bFGF erzielen kann und ist weit von der vollen Signalstärke, die durch größere FGF-Mengen induziert wird, entfernt. Dieses könnte auf eine relativ geringe Freisetzung von FGF-Molekülen durch HAPB hinweisen.

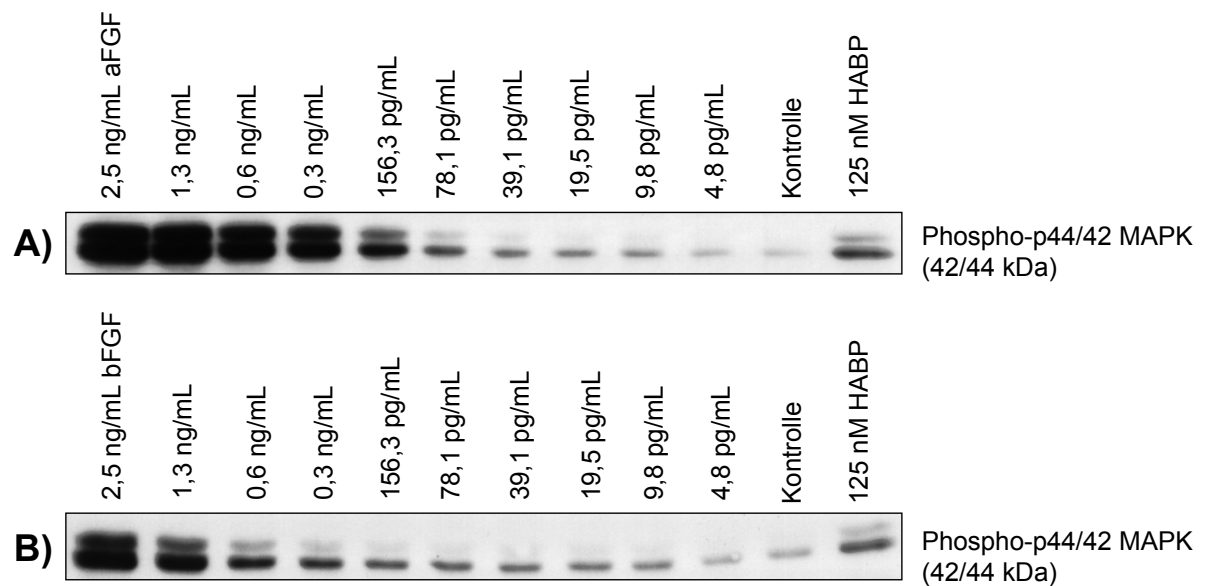


Abbildung 2.14: Die durch HABP ausgelöste Phosphorylierung von ERK1/2 ist im Vergleich zum direkt mit aFGF bzw. bFGF induzierten Signal sehr schwach. Ruhende HUVECs wurden mit einer Konzentrationsreihe (4,8 pg/mL bis 2,5 ng/mL) aFGF (A) bzw. bFGF (B) für 10 min stimuliert. Der Vergleichsansatz wurde für 15 min mit 125 nM HABP behandelt. Der Nachweis von Phospho-p44/42 MAPK wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.1.3.10 Aktivierung von MAPK-abhängigen Transkriptionsfaktoren durch HABP

Eine der wichtigsten Funktionen der MAPK-Kaskaden ist die Regulation der Genexpression als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli. Das im Zuge der MAPK-Kaskade aktivierte ERK1/2-Dimer kann einerseits im Cytosol Zielproteine regulieren, die Einfluß auf die Expression spezifischer Gene haben, und andererseits, nach Translokation in den Nukleus, durch die Phosphorylierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren als Regulator der Genexpression fungieren. Die Untersuchung des Aktivierungszustandes der MAPK-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB, c-Myc und Elk-1 in HUVECs resultierte in einer deutlichen zeitabhängigen Phosphorylierung von CREB und c-Myc nach Inkubation mit 125 nM HABP (Abb. 2.15). Im Falle des Transkriptionsfaktors Elk-1 wurde keine Aktivierung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

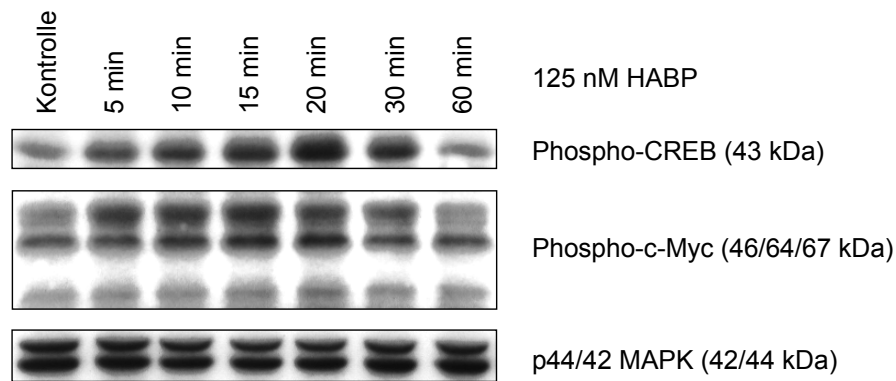


Abbildung 2.15: Zeitabhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und c-Myc durch HABP in HUVECs. Das Stimulationsexperiment und die folgende Western Blot-Analyse wurden wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt. Der Nachweis der p44/42-Gesamtmenge in den Proben erfolgte mit einem Antikörper gegen die nicht-aktivierte Form des Proteins.

CREB ist ein bZip-Transkriptionsfaktor, dessen aktivierte Form durch Bindung an die Regulatorsequenz *cAMP-response element* (CRE) die Transkription „stromabwärts“ gelegener Gene initiiert. Neben dem p44/42 MAPK-Signalweg können auch einige andere Kinasen an der Phosphorylierung von CREB beteiligt sein. Beispielsweise kann CREB auch durch die im Zuge einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels aktivierte Calmodulin (CaM)-Kinase II aktiviert werden. Da HABP in HUVECs eine Mobilisierung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen und eine CREB-Aktivierung auslöst, sollte ein eventueller Zusammenhang zwischen beiden Befunden untersucht werden. Aufgrund dessen wurde überprüft, ob die HABP-induzierte Aktivierung von CREB auch beobachtet werden kann, wenn der ERK1/2-Signalweg durch die Inhibition der Proteinkinasen MEK1/2 mit ihrem spezifischen Inhibitor U0126 oder die Hemmung des FGFR1 durch den Antagonisten SU5402 unterdrückt ist. Komplementär wurde der Einfluß des B2R-Antagonisten HOE140 auf die HABP-vermittelte CREB-Aktivierung untersucht. Trotz Inhibition des ERK1/2-Signalweges durch U0126 und SU5402 induziert HABP eine deutliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. Durch die Inhibition des B2R mit HOE140 wird die HABP-vermittelte CREB-Aktivierung hingegen vollständig unterdrückt (Abb. 2.16). Wie diese Resultate verdeutlichen, verläuft die Aktivierung von CREB abhängig vom B2R, aber unabhängig vom ERK1/2-Signalweg. Dieses läßt die Vermutung zu, dass die CREB-Aktivierung im Rahmen der B2R-abhängigen Ausschüttung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen über die CaM-Kinase II verläuft, was in nachfolgenden Studien zu klären bleibt.

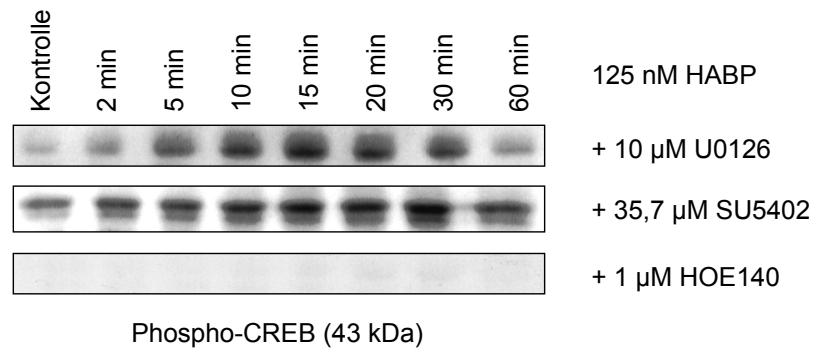


Abbildung 2.16: Die Aktivierung von CREB durch HABP ist B2-Rezeptor-abhängig, aber unabhängig vom ERK1/2-Signalweg. Serumfreie Zellen wurden mit 10 µM MEK1/2-Inhibitor (U0126), 35,7 µM FGFR1-Inhibitor (SU5402) oder 1 µM B2R-Antagonist (HOE140) vorinkubiert und anschließend mit 125 nM HABP für 15 min stimuliert. Die Proben wurden anschließend mit phosphospezifischen Anti-CREB-Antikörpern im Western Blot analysiert.

Die ERK1/2-abhängige Phosphorylierung von CREB kann in manchen Fällen über die beiden Proteinkinasen p90RSK und MSK1/2 verlaufen. Beide können von ERK1/2 aktiviert werden und im Anschluß selbst die Phosphorylierung von CREB herbeiführen. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse belegen zwar, dass CREB nach HABP-Stimulierung ERK1/2-unabhängig phosphoryliert wird, trotzdem wurde zusätzlich auch die HABP-vermittelte Aktivierung von p90RSK und MSK1/2 in HUVECs getestet. In der Western Blot-Analyse war jedoch keine HABP-induzierte Aktivierung dieser beiden Proteine in HUVECs zu beobachten (nicht gezeigt). Dieses bestätigt die bereits beschriebenen Befunde, dass die HABP-vermittelte CREB-Aktivierung ERK1/2-unabhängig ist und keine Verbindung zwischen der Aktivierung von ERK1/2 und CREB besteht (siehe auch Abb. 2.20).

Auch für den Transkriptionsfaktor c-Myc, der eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Zellzyklus einnimmt, wurde überprüft, ob seine Aktivierung im Zusammenhang mit einem der beiden in HUVECs identifizierten HABP-abhängigen Signalwege steht. Durch die Inhibition von MEK1/2 mit U0126 und von FGFR1 mit SU5402 wurde untersucht, ob die Aktivierung von c-Myc abhängig von der Aktivierung des ERK1/2-Signalweges ist. Ebenso sollte die Hemmung des B2R mit HOE140 Aufschluß darüber geben, ob c-Myc über den B2R-abhängigen HABP-induzierbaren Signalweg in HUVECs aktiviert wird. Hier stellte sich heraus, dass die Phosphorylierung von c-Myc nach Vorinkubation der Zellen mit den aufgeführten Inhibitoren sowohl durch U0126 als auch durch SU5402 unterdrückt wird und die c-Myc-Aktivierung somit ERK1/2-abhängig ist. Die Inhibition des B2R mit HOE140 beeinflusst die c-Myc-Phosphorylierung durch HABP nicht (Abb. 2.17).

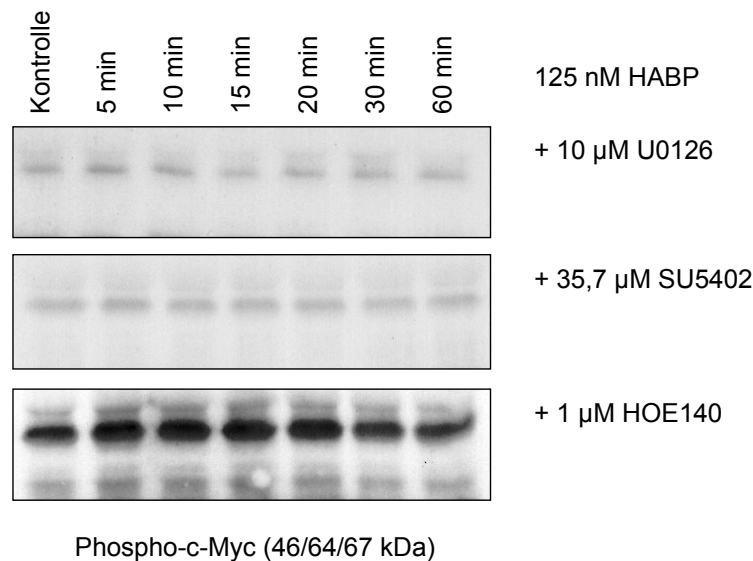


Abbildung 2.17: Die HABP-induzierte Aktivierung von c-Myc in HUVECs ist abhängig vom ERK1/2-Signalweg. Serumfreie Zellen wurden mit 10 µM MEK1/2-Inhibitor (U0126), 35,7 µM FGFR1-Inhibitor (SU5402) oder 1 µM B2R-Antagonist (HOE140) vorinkubiert und anschließend 15 min mit 125 nM HABP stimuliert. Die Western-Blot-Analyse der Proben erfolgte mit phosphospezifischen Anti-c-Myc-Antikörpern.

Neben den Transkriptionsfaktoren wurden auch verschiedene Translationsfaktoren auf eine HABP-induzierte Aktivierung hin untersucht. Sowohl der Translationsfaktor eIF-4E als auch p70S6K werden infolge der HABP-Behandlung in HUVECs aktiviert (nicht gezeigt). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Translationsfaktoren und den beiden ermittelten HABP-abhängigen Signalwegen bleibt zu klären.

2.1.3.11 Die Proteinkinasen p38 und SAPK/JNK werden durch HABP nicht aktiviert

Außer den bisher beschriebenen MAP-Kinasen wurden in eukaryotischen Zellen weitere funktionell vergleichbare Proteine, wie u. a. die Stress-aktivierte-Proteinkinase/c-Jun-N-terminale Kinase (SAPK/JNK) und die p38-Kinase charakterisiert. Sie werden gemeinsam mit den Kinasen ERK1/2 unter dem Begriff „MAP-Kinasen“ zusammengefasst und haben die Eigenschaften von Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, die im Cytosol nach Einwirkung bestimmter extrazellulärer Signale aktiviert und anschließend in den Zellkern transferiert werden. Nach Bindung sehr unterschiedlicher extrazellulärer Signalmoleküle erfolgt die Aktivierung einer bestimmten MAP-Kinase über eine hoch konservierte Kaskade von Proteinkinasen. Durch die MAP-Kinasen werden jeweils bestimmte Zellreaktionen im Rahmen der Morphogenese, des Zelltods oder der zellulären Antwort auf Stresssignale gesteuert. Die MAP-Kinasen SAPK/JNK und p38 werden vorwiegend infolge von Stress und inflammatorischen Prozessen durch Cytokine aktiviert.

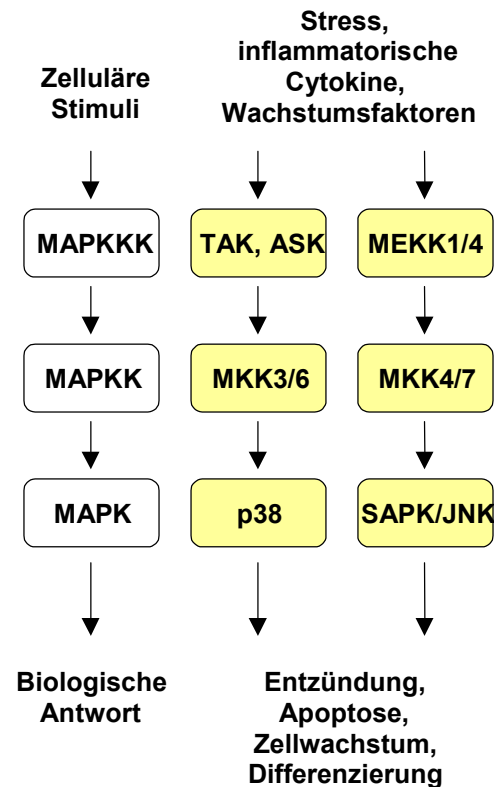


Abbildung 2.18: Übersicht über die Mitogen-aktivierten p38- und SAPK/JNK-abhängigen Protein-kinase-Kaskaden. Die Aktivierung von p38 und SAPK/JNK erfolgt durch in Serie geschaltete Kaskaden von Phosphorylierungsschritten. Eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert zunächst eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und dieser wiederum die MAP-Kinasen (MAPK) p38 oder SAPK/JNK. Die weiß hinterlegten Kästchen kennzeichnen die allgemeinen Bezeichnungen der Komponenten einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade. Die an den p38- und SAPK/JNK-abhängigen Signalwegen beteiligten Proteinkinasen sind durch gelb gefärbte Kästchen dargestellt.

Im Verlaufe der Analyse HABP-induzierter Signalwege in HUVECs wurden auch die MAP-Kinasen SAPK/JNK und p38 auf ihren Aktivierungszustand hin untersucht. Serum-reduzierte Zellen wurden in einer Zeitreihe von 30s bis 60 min mit 125 nM HABP inkubiert und die Zelllysate anschließend im Western Blot auf die phosphorylierte Form der MAP-Kinasen p38 und SAPK/JNK hin untersucht. In HUVECs wird jedoch keiner der beiden MAPK-Signalwege von HABP aktiviert. Weder die phosphorylierte (aktivierte) Form von SAPK/JNK noch die von p38 waren im Western Blot nachzuweisen (Abb. 2.19).

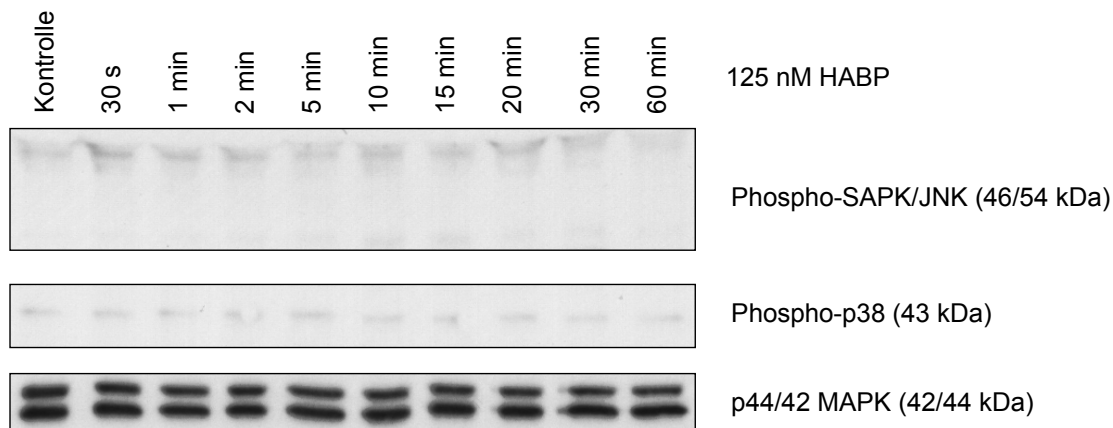


Abbildung 2.19: Die beiden MAP-Kinasen SAPK/JNK und p38 werden in HUVECs durch HABP nicht aktiviert. Serumfreie Zellen wurden wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben in Form einer Zeitreihe mit 125 nM HABP stimuliert und die HUVEC-Zelllysate anschließend im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die aktivierte Form von p38 und SAPK/JNK analysiert. Die p44/42-Gesamtmenge in den Proben wurde mit einem Antikörper gegen die nicht-aktivierte Form des Proteins nachgewiesen.

Neben p38 und SAPK/JNK wurde ein weiteres Schlüsselprotein intrazellulärer Signaltransduktion, die Akt-Kinase (Proteinkinase B, PKB), auf HABP-induzierte Aktivierung in HUVECs getestet. Die Akt-Kinase spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Kontrolle des Gleichgewichts zwischen dem Überleben von Zellen und dem Zelltod (Apoptose). Auch hier wurde keine Aktivierung des Proteins durch eine Behandlung der Zellen mit HABP beobachtet (nicht gezeigt).

2.1.3.12 Zusammenfassung der HABP-vermittelten Signaltransduktion in HUVECs

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch HABP in HUVECs demonstrieren, dass HABP zwei unterschiedliche, voneinander völlig getrennte Signalwege in dieser Zelllinie aktiviert. Zum einen induziert HABP die Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Speichern, welche nach der HABP-vermittelten Freisetzung von BK aus HK über die Aktivierung des B2R verläuft. Zum anderen aktiviert HABP den ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweg in HUVECs. Dieses wurde durch den Nachweis der Phosphorylierung von Raf, MEK1/2 und ERK1/2 belegt. Die Inhibition von MEK1/2 mit dem spezifischen Inhibitor U0126 unterdrückt das ERK1/2-Signal und beweist die Abhängigkeit dieser Aktivierung von MEK1/2. Die HABP-induzierte Aktivierung von p44/42 MAPK verläuft, vermutlich nach proteolytischer Freisetzung von FGF auf der ECM durch HABP, über den FGFR1. Des Weiteren induziert HABP die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren CREB und c-Myc, wobei CREB über den BR2-abhängigen und c-Myc über den FGFR1-abhängigen

Signalweg aktiviert wird. Dieses wurde durch Inhibitionsstudien überprüft. Eine Aktivierung von CREB über die Kinasen p90RSK und MSK1/2, die nach Literaturangaben eine mögliche Verbindung zwischen der ERK1/2-Kaskade und CREB herstellen können, besteht nicht, da beide Kinasen durch HABP-Behandlung nicht aktiviert werden. Folglich ist anzunehmen, dass CREB ausschließlich über den Ca^{2+} -abhängigen Signalweg über den B2R aktiviert wird. Aufgrund dieser Ergebnisse können zwei verschiedene Signalwege in HUVECs postuliert werden, welche über die Freisetzung von Mediatoren wie BK und FGF durch HABP induziert werden. In Abb. 2.20 sind die in dieser Arbeit analysierten HABP-vermittelten Signalwege in HUVECs in einem Übersichtsschema dargestellt.

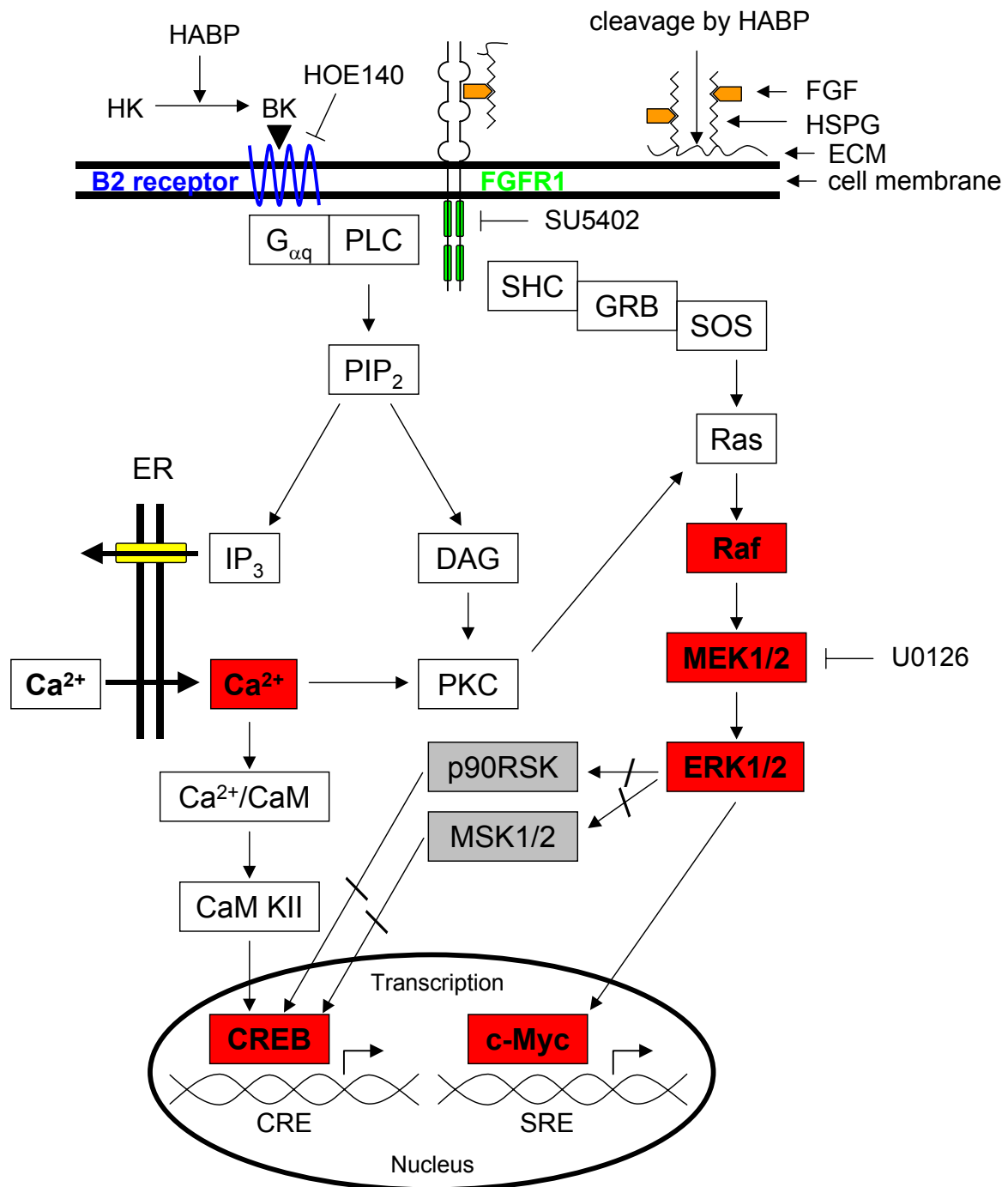


Abbildung 2.20: Übersicht über die HABP-vermittelte Signaltransduktion in HUVECs. HABP induziert in HUVECs zwei verschiedene, voneinander unabhängige Signalwege, die über den B2R und den FGFR1 vermittelt werden. Schlüsselauslöser sind in beiden Fällen sekundäre Signale, BK und FGF, die durch die proteolytische Aktivität von HABP freigesetzt werden und den jeweiligen Rezeptor aktivieren. Freigesetztes BK löst über den BR2 eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels aus, wohingegen FGF über die Aktivierung des FGFR1 den ERK1/2-Signalweg induziert. Weitere Beschreibungen im Text. Rot gefärbte Schriftfelder kennzeichnen Proteine, die durch HABP-Stimulation aktiviert werden, grau gefärbte stehen für diejenigen, deren Nicht-Aktivierung gezeigt werden konnte. Proteine in weißen Schriftfeldern wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Abkürzungen: BK: Bradykinin, CRE: cAMP response element, ECM: extrazelluläre Matrix, ER: endoplasmatisches Reticulum, FGF: Fibroblasten-Wachstumsfaktor, FGFR1: FGF-Rezeptor1, HK: HMW-Kininogen, HOE140: B2-Rezeptor-Antagonist, HSPG: Heparansulfat-proteoglykan, SRE: serum response element, SU5402: FGFR1-Inhibitor, U0126: MEK1/2-Inhibitor.

Die Ergebnisse aller in dieser Arbeit auf eine HABP-induzierte Aktivierung hin untersuchten Signalwege und ihrer Komponenten, die in den Kapiteln 2.1.3.1 bis 2.1.3.11 dargestellt sind, auch die in Abb. 2.20 nicht berücksichtigten, sind in der unten aufgeführten Tabelle (Tab 2.1) zusammengestellt. Die zur Aufschlüsselung der einzelnen Signalwege verwendeten Inhibitoren und Komplexbildner wurden in der Tabelle vermerkt.

Protein	HABP-induziert	+ MEK1/2-Inhibitor (U0126)	+ FGFR1-Inhibitor (SU5402)	+ B2-Rezeptor-Inhibitor (HOE140)	PTX	CTX	EGTA	EGTA-AM
Akt	—							
c-Myc	+	—	—	+				
c-Raf	+							
CREB	+	+	+	—				
eIF4E	+							
Elk-1	—							
FGFR1	(+)							
MEK1/2	+							
MSK1	—							
p38	—							
p44/42	+	—	—	+	+	+	+	+
p70S6K	+							
p90RSK	—							
SAPK/JNK	—							

Tabelle 2.1: Tabellarische Übersicht über die HABP-induzierte Aktivierung von Proteinen der in Endothelzellen untersuchten Signalwege und den Einfluß verschiedener Inhibitoren. Abkürzungen: PTX: Pertussistoxin, CTX: Cholera toxin.

2.2 Regulation von HABP auf zellulärer Ebene

Plasmatische Proteasen des Hämostasesystems unterliegen einem strengen Regulationsmechanismus, da Fehlregulationen sehr schnell zu einer Blutungs- oder Thromboseneigung führen können. Die Labilität der Gerinnungsfaktoren trägt hier entscheidend zur Gerinnungskontrolle bei. Durch die Blutzirkulation werden die Enzyme und Kofaktoren der Blutgerinnung und Fibrinolyse stark verdünnt und liegen im Plasma in sehr geringen Konzentrationen vor. Für ihre Wirkung im Hämostasesystem ist daher ein Konzentrationseffekt an speziellen Oberflächen zur Ausbildung der Multikomponentenkomplexe notwendig. Des Weiteren werden Plasmaproteasen von der Leber aus dem Blut herausgefiltert und anschließend proteolytisch abgebaut. Aus diesem Grund haben die plasmatischen Gerinnungsfaktoren eine kurze Lebensdauer. Im Falle von Serinproteasen werden die Enzyme entweder alleine oder im Komplex mit spezifischen Serinproteaseinhibitoren (Serpinen) über rezeptorvermittelte Endocytose aus dem Plasma entfernt und in der Zelle metabolisiert, was der Regulation ihrer Aktivität dient. Dieser Prozess der

Entfernung von Serinproteasen aus dem Plasma wird auch als Klärungs (*clearance*)-Prozess bezeichnet. Beispiele plasmatischer Serpinprotease-Komplexe, die über diesen Mechanismus aus dem Plasma entfernt werden sind der Thrombin/ATIII-Komplex (FAIR & PLOW, 1986; TAKEYA *et al.*, 1994), der uPA/PAI-1-Komplex (OLSON *et al.*, 1992), und der tPA/PAI-1-Komplex (CAMANI & KRUIHOF, 1994; ANDREASEN *et al.*, 1994).

2.2.1 HABP wird von humanen Endothelzellen internalisiert

Um Hinweise zu bekommen, ob HABP als plasmatische Serinprotease einem ähnlichen *clearance*-Prozess unterliegt, wurden Immunfluoreszenzstudien mit HUVECs durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden HUVECs auf Fibronectin-beschichteten Objektträgern herangezüchtet, die Zellen 1 h bei 37°C mit 250 nM HABP in HMTS inkubiert, gewaschen und mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Um die Zellmembran für die Antikörper durchgängig zu machen und die intrazelluläre Lokalisation von HABP zu prüfen, wurden die Zellen mit 0,5 % TX-100 permeabilisiert. Nach Inkubation mit einem monoklonalen Anti-HABP-Antikörper und einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Sekundärantikörper wurden die Präparate im Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Auswertung ergab, dass HABP nach einstündiger Inkubation in Form von cytoplasmatischen Vesikeln in den Endothelzellen nachweisbar ist. Aufgrund ihrer zumeist kreisförmigen Anordnung scheinen diese Vesikel im Cytoplasma rund um den Zellkern lokalisiert zu sein (Abb. 2.21, A). Die Negativkontrolle wurde mit einem Antikörper gegen ein in HUVECs nicht existentes Antigen durchgeführt (α -smooth-muscle-actin-Antikörper) (Abb. 2.21, B). Ohne die vorherige Inkubation der Zellen mit HABP war die Protease in HUVECs nicht nachzuweisen, was darauf hindeutet, dass das Protein von dieser Zelllinie auch nicht exprimiert wird. Innerhalb einer Zeitreihe mit Inkubationszeiten zwischen 5 min und 6 h wurde eine Internalisierung der Plasmaprotease in HUVECs von 30 min bis 4 h beobachtet (nicht gezeigt). Der hydrolytische Abbau von HABP in den Endocytose-Vesikeln ist hiernach innerhalb von 4 h abgeschlossen.

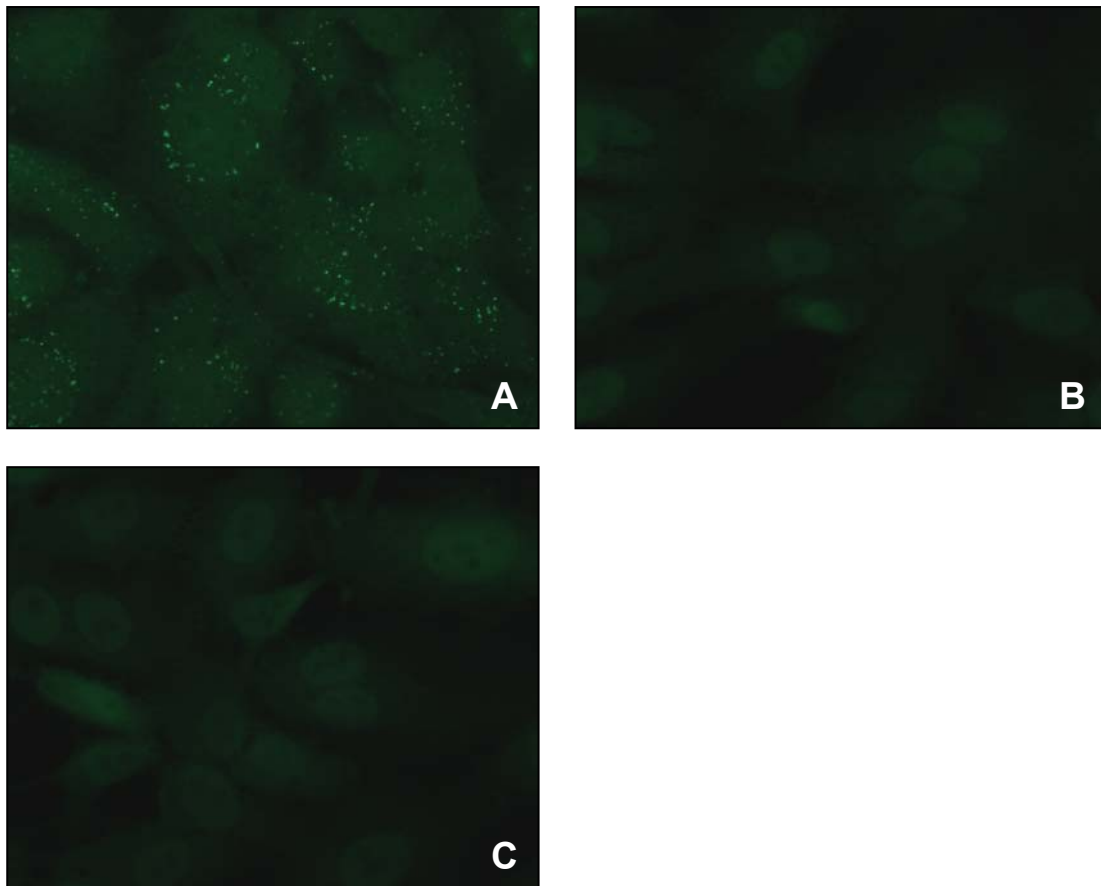


Abbildung 2.21: HABP wird von HUVECs internalisiert. Konfluente HUVECs wurden 1 h bei 37°C in Anwesenheit (A, B) oder Abwesenheit (C) von 250 nM HABP in HMTS inkubiert, gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden anschließend permeabilisiert, mit 2,5 µg/mL eines monoklonalen Anti-HABP-Antikörpers (A, C) oder eines monoklonalen Anti- α -smooth-muscle-actin-Antikörpers (Negativkontrolle) (B) aus Maus inkubiert und mit einem FITC-markierten Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper entwickelt.

2.2.2 Nachweis lysosomaler Vesikel

Während der Endocytose von extrazellulären Molekülen werden diese zunächst in endocytotische Vesikel eingeschlossen und verschmelzen kurz darauf mit zellulären Lysosomen, in denen der hydrolytische Abbau stattfindet. Die für diesen Abbau verantwortlichen lysosomalen Enzyme sind Hydrolasen, die nur bei einem intraluminalen pH-Wert der Lysosomen zwischen 4,5 und 5 aktiv sind. Mit Hilfe Fluoreszenz-markierter azidotroper Reagenzien (LysoTracker Red DND-99) kann man endocytotische Organellen anfärben. Für die Internalisierung von HABP in HUVECs sollte hiermit der Nachweis geführt werden, ob HABP in Lysosomen im Cytoplasma lokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurden HUVECs auf Fibronectin-beschichteten Objektträgern herangezüchtet und nach erreichter Konfluenz gleichzeitig mit 250 nM HABP und 75 nM LysoTracker Red

DND-99 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit monoklonalen HABP-spezifischen Antikörpern und einem FITC-markierten Sekundärantikörper behandelt. Dadurch wurde zum einen der Nachweis der internalisierten Protease und zum anderen gleichzeitig die Lokalisation der Lysosomen ermöglicht. Diese Kolo­kalisation von Lysosomen und endozytierter Protease ist in Abb. 2.22 (A und B) deutlich zu erkennen. Die Bildung der Lysosomen ist zudem HABP-abhängig, da sie in der parallel durchgeführten Kontrolle, die in Abwesenheit von HABP mit dem Lysosomenindikator behandelt wurde, nicht zu beobachten war (C und D). Daher kann davon ausgegangen werden, dass HUVECs einen wirksamen auf Endocytose basierenden Mechanismus besitzen, um HABP aus dem Plasma zu entfernen und zu neutralisieren. Der genaue Mechanismus der Internalisierung von HABP bleibt in nachfolgenden Studien zu überprüfen.

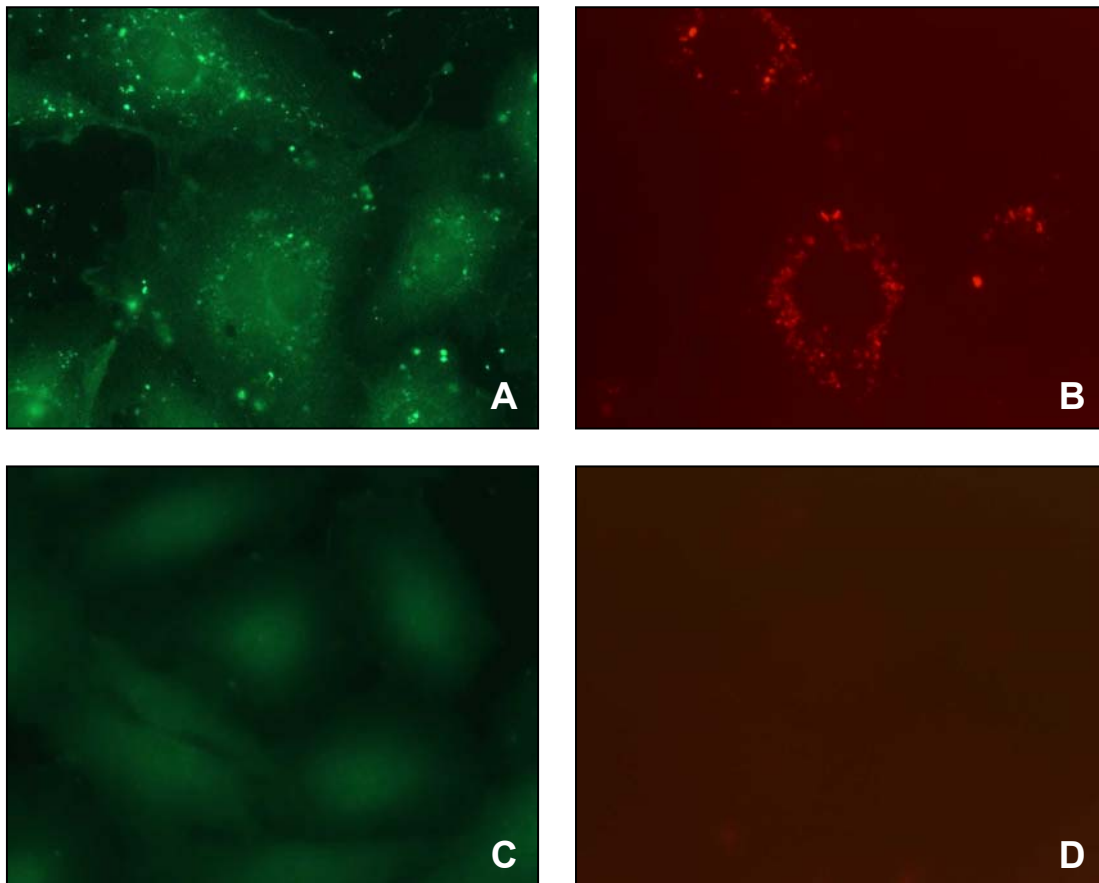


Abbildung 2.22: Kolo­kalisation von internalisierter HABP und Lysosomen. Konfluente HUVECs wurden gleichzeitig mit 250 nM HABP und 75 nM LysoTracker Red DND-99 (A, B) oder nur mit 75 nM LysoTracker Red DND-99 (C, D) für 1 h bei 37°C inkubiert, gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden anschließend permeabilisiert, mit 2,5 µg/mL eines monoklonalen Anti-HABP-Antikörpers aus Maus inkubiert und mit einem FITC-markierten Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper entwickelt. Die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop wurde mit den für FITC und entsprechenden Filtern durchgeführt. A, C: Immunfluoreszenz-Nachweis mit Anti-HABP-Antikörper und FITC-markiertem Sekundärantikörper; B, D: Immunfluoreszenz-Nachweis mit LysoTracker Red DND-99.

2.2.3 Bindung von HABP auf HUVEC-Zelloberfläche ist nicht nachweisbar

Da Rezeptor-Wechselwirkungen häufig mit einer stabilen Bindung des Liganden an den zellmembranständigen Rezeptor einhergehen, wurde auch überprüft, ob eine Bindung von HABP auf der Zelloberfläche von HUVECs nachzuweisen ist. Eine direkte Aktivierung eines endothelialen Rezeptors wurde innerhalb der hier beschriebenen Studien zu HABP-induzierten Signalwegen zwar nicht beobachtet, dennoch kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass HABP auf HUVECs auch direkt mit einem zurzeit noch unbekannten Rezeptor in Wechselwirkung tritt. In Fluoreszenzexperimenten, die wie in Kap. 2.2.1 beschrieben jedoch mit nicht-permeabilisierten Zellen, deren Zellmembran für die verwendeten Antikörper nicht durchgängig ist und die somit den Nachweis von Zelloberflächenantigenen zulassen, durchgeführt wurden, wurde kein Fluoreszenz-Signal beobachtet (Abb. 2.23). Dieses läßt eine direkte Bindung von HABP an endotheliale Zelloberflächenstrukturen unwahrscheinlich erscheinen.

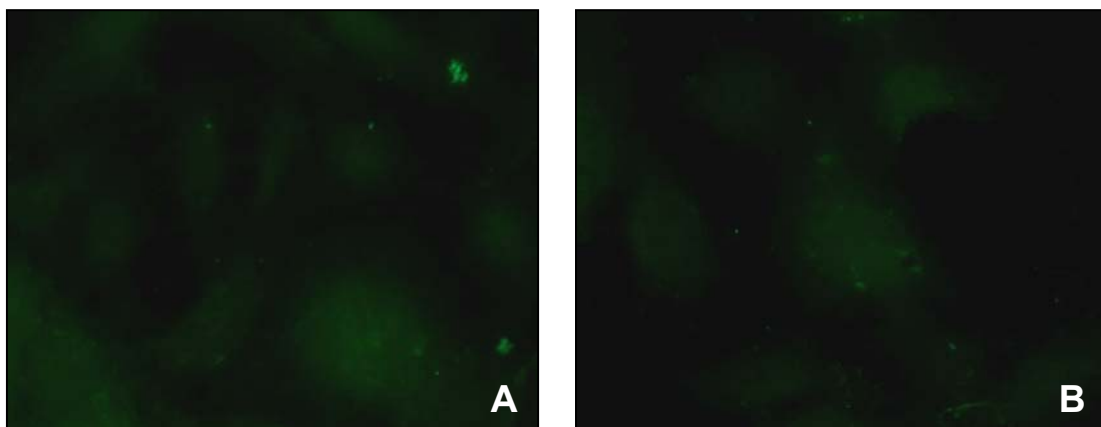


Abbildung 2.23: HABP ist auf der Zelloberfläche von HUVECs nicht nachzuweisen. Konfluente HUVECs wurden 1 h bei 37°C in Anwesenheit (A, B) von 250 nM HABP in HMTS inkubiert, gewaschen und fixiert. Danach wurden die Zellen mit 2,5 µg/mL eines monoklonalen Anti-HABP-Antikörpers (A) oder eines monoklonalen Anti- α -smooth-muscle-actin-Antikörpers (Negativkontrolle) (B) aus Maus inkubiert und mit einem FITC-markierten Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper entwickelt.

3 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Untersuchung zellulärer Funktionen der Plasmaprotease HABP und die Aufklärung HABP-induzierter intrazellulärer Signaltransduktionswege in HUVECs. Anhand der dargestellten Studien zur Analyse der Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wird deutlich, dass HABP durch die proteolytische Freisetzung von Mediatoren in HUVECs zwei voneinander unabhängige Signalwege aktivieren kann. Zum einen löst die Freisetzung von BK aus Zelloberflächen-assoziiertem und exogenem HK eine Aktivierung des B2R aus, wodurch eine Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern induziert wird. Zum anderen führt die Stimulation von ruhenden HUVECs mit HABP zu einer FGFR1-vermittelten Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges, dessen Schlüsselauslöser vermutlich der durch HABP freigesetzte Wachstumsfaktor FGF ist. Beiden Wegen der HABP-induzierten Signaltransduktion liegt eine Rezeptoraktivierung über sekundäre Signale zugrunde. Für eine direkte Aktivierung eines Rezeptors durch HABP gibt es bisher keine Hinweise. Des Weiteren wurde in Immunfluoreszenzexperimenten nachgewiesen, dass HABP von Endothelzellen internalisiert wird und in lysosomalen Vesikeln im Cytoplasma der Zellen lokalisiert ist. Diese Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln im Einzelnen diskutiert.

3.1 Bradykinin-vermittelte Signaltransduktion in Endothelzellen

HABP wurde von ETSCHIED *et al.* (2002a) als neuartige plasmatische Kininogenase mit Kallikrein-ähnlichen Eigenschaften identifiziert, die in der Lage ist, sowohl HK als auch LK *in vitro* zu spalten und das vasoaktive Peptid BK freizusetzen (siehe Abb. 1.5). Dieser Befund bot einen Anhaltspunkt auf der Suche nach einem Rezeptor, der die im Vorfeld dieser Arbeit beobachtete intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in HUVECs vermittelt. Nach einer Publikation von BUSSE UND FLEMING induziert BK in HUVECs über die Aktivierung des B2R eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (BUSSE & FLEMING, 1996). Die Kallikrein-ähnliche Eigenschaft von HABP gab daher Anlass zu der Vermutung, dass BK durch die proteolytische Spaltung von zellgebundenem HK durch HABP freigesetzt wird, und dieses möglicherweise die Aktivierung von Endothelzellen induzieren kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigen diese Hypothese, da die Aktivierung durch HABP abhängig von der enzymatischen Aktivität der

Protease ist, eine Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Speichern erfolgt, und dieser Effekt in Gegenwart des B2R-Antagonisten HOE140 vollständig unterdrückt werden kann.

Die Erhöhung der cytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird von nahezu allen menschlichen Zellen als universeller Trigger benutzt, um zelluläre Reaktionen auszulösen. Ca^{2+} -Ionen spielen daher als intrazelluläre, sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von Stimulus-abhängigen zellulären Antworten. Ihre Konzentration in der Zelle wird von extrazellulären Signalen streng kontrolliert. Die Konzentration von Ca^{2+} -Ionen im Cytoplasma ist im Vergleich zum extrazellulären Medium oder dem endoplasmatischen Reticulum (ER) normalerweise sehr gering (10-100 nM) und wird durch ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ständig niedrig gehalten. Eine Vielzahl von Reaktionen wie beispielsweise Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen können jedoch einen plötzlichen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 500-1000 nM durch die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen, die sich in der Plasmamembran oder in der Membran von Ca^{2+} -Speichern wie dem ER oder anderen intrazellulären Vesikeln befinden, auslösen. Ca^{2+} -Ionen werden aus intrazellulären Speichern im ER mobilisiert. Bereits durch einen geringen Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Gehalts werden zahlreiche Zellreaktionen angeschaltet. Die Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle wird durch IP_3 (Inositol-1,4,5-Triphosphat) vermittelt. IP_3 ist ein weiterer *second messenger*, dessen Bildung infolge der Rezeptoraktivierung durch die Phospholipase C (PLC) katalysiert wird. Die Synthese des dritten Botenstoffes Diacylglycerin (DAG) erfolgt gleichzeitig zur IP_3 -Bildung. DAG aktiviert die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PKC), die infolgedessen zur Aktivierung von Proteinkinasekaskaden führen kann (LODISH *et al.*, 2001; BOOTMAN & LIPP, 2001; SILBERNAGL & DESPOPOULOS, 2003).

Im Zusammenhang mit der HABP-vermittelten Aktivierung des B2R über BK und der damit verbundenen Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels wurde im Rahmen der hier dargestellten Studien auch die spezifische Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element-binding protein*) beobachtet. Durch die Hemmung des B2R mit dem Antagonisten HOE140 wurde neben der Induktion des Ca^{2+} -Signals auch die Aktivierung und Phosphorylierung von CREB unterdrückt. Die Hemmung des durch HABP aktivierten ERK1/2-Signalweges durch den MEK-Inhibitor U0126 oder den FGFR1-Inhibitor SU5402 hatte keinen Einfluß auf die Aktivierung von CREB (siehe Abb. 2.16). Dieses läßt darauf schliessen, dass CREB infolge der HABP-Stimulation von HUVECs unabhängig von ERK1/2 und ausschliesslich über den B2R-abhängigen Ca^{2+} -Weg aktiviert wird. Die Plasmaprotease induziert in dieser Zelllinie demnach zwei völlig

unterschiedliche Signaltransduktionswege. Botenstoffe wie Ca^{2+} und Calmodulin, aber auch die Proteinkinase A (PKA) können zur Aktivierung und Phosphorylierung von CREB führen, welches durch die intrazelluläre cAMP-Konzentration reguliert wird. Als Transkriptionsfaktor stimuliert CREB die Transkription von Genen, die cAMP response-Elemente (CREs) enthalten. CREB bindet dabei als Dimer an die konservierten CREs, die in der Promotorregion zahlreicher eukaryotischer Gene zu finden sind (GREWAL *et al.*, 2000; QUINN, 2002). Welche Gene im Falle der Aktivierung durch HABP in HUVECs transkribiert werden, bedarf weiterer Klärung.

Voraussetzung für die HABP-vermittelte Freisetzung von BK durch proteolytische Spaltung von Zelloberflächen-assoziiertem HK ist eine ausreichende Menge an zellgebundenen und für die Spaltung zugängigen HK-Molekülen. HK wird von HUVECs exprimiert (SCHMAIER *et al.*, 1988) und kann über verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden werden. Zu den bisher identifizierten endothelialen HK-Rezeptoren gehören der uPAR, der C1qR, der Cytokeratin-1-Rezeptor-Komplex, der GPIb-IX-V-Rezeptor-Komplex und Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) (COLMAN *et al.*, 1997; BRADFORD *et al.*, 1997; HASAN *et al.*, 1998; RENNÉ *et al.*, 2000; MAHDI *et al.*, 2001). Die Bindung von HK an das Endothel gewährleistet unter anderem eine direkte Wirkung der freigesetzten BK-Moleküle in Form einer lokalen Stimulation des Endothels (HASAN *et al.*, 1995). Da HK das Pro-Hormon des gebildeten BKs darstellt und BK eine sehr geringe Halbwertszeit von 15-30 Sekunden besitzt, ist es wichtig, dass HK in nächster Nähe der endothelialen BK-Rezeptoren lokalisiert ist (LIN *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 2001). Über die Anzahl der insgesamt auf Endothelzellen vorhandenen Bindestellen für HK existieren in der Literatur allerdings gegensätzliche Meinungen. Während in den meisten publizierten Bindestudien 10^6 - 10^7 HK-Bindestellen pro Zelle beschrieben wurden (SCHMAIER *et al.*, 1988; VAN IWAARDEN *et al.*, 1988a; VAN IWAARDEN *et al.*, 1988b; BERRETTINI *et al.*, 1992; HASAN *et al.*, 1995), belegt eine erst kürzlich erschienene Arbeit, dass die Anzahl der HK-Bindestellen auf HUVECs nur ca. 1×10^5 pro Zelle beträgt (BAIRD & WALSH, 2003). Diese Studie basiert auf einem neuen Testsystem mit „Microcarrier beads“, welches ermöglicht, die unspezifische Bindung an das Kunststoffmaterial der Mikrotiter-Platten zu umgehen. Geht man von 10^5 gebundenen HK-Molekülen pro Zelle aus, vorausgesetzt es sind alle möglichen Bindestellen auf der Zelloberfläche besetzt, könnten im Falle einer proteolytischen Spaltung durch HABP theoretisch ebenso viele BK-Moleküle pro Zelle entstehen.

Die HABP-vermittelte Freisetzung von BK auf der Zelloberfläche von HUVECs wurde in einem Radioimmunoassay (RIA) mit BK-spezifischen Antikörpern nachgewiesen und die BK-Konzentration im Zellüberstand ermittelt. Da die beobachtete Ca^{2+} -Mobilisierung in HUVECs direkt nach Zugabe von HABP ausgelöst wird, sollte unter den gewählten Versuchsbedingungen BK im Überstand nachweisbar sein. Es wurde allerdings erst nach 45 min Inkubation der Zellen mit HABP eine signifikante Erhöhung der BK-Menge beobachtet. Innerhalb der ersten Minuten nach Zugabe von HABP war eine Bildung von BK im RIA nicht quantitativ nachzuweisen. Der nach 45-minütiger Inkubation mit HABP ermittelte Wert von 60 pM BK im Überstand entspricht ca. 1/50 der BK-Menge, welche für die Induktion eines Ca^{2+} -Signals in Endothelzellen benötigt wird. Von BUSSE UND LAMONTAGNE wurde beschrieben, dass bereits 3 nM BK ausreichen, um eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HUVECs zu induzieren (BUSSE & LAMONTAGNE, 1991). Ähnliche Befunde wurden auch von anderen Autoren für Rinderendothelzellen publiziert (COLDEN-STANDFIELD *et al.*, 1987; LÜCKHOFF *et al.*, 1988). Da das HABP-abhängige Ca^{2+} -Signal jedoch schon innerhalb der ersten Minute nach Stimulation mit HABP ausgelöst wird, können die RIA-Ergebnisse keinen konkreten Beweis dafür erbringen, dass durch HABP freigesetztes BK den Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels auslöst. Dennoch kann man die Experimente in Gegenwart des B2R-Antagonisten HOE140, welcher das HABP-vermittelte Signal unterdrückt, als indirekten Beweis für die BK-Freisetzung und die anschließende Aktivierung des B2R ansehen.

Da im RIA nur frei in Lösung befindliche BK-Moleküle gemessen werden, kann man vermuten, dass viele BK-Moleküle möglicherweise erst gar nicht in den Überstand diffundieren, sondern direkt in der Nähe ihres Wirkungsortes auf der Zelloberfläche oder von zellulären Rezeptoren wieder gebunden werden. Im Hinblick auf die kurze Halbwertszeit von BK unter physiologischen Bedingungen erscheint dies auch verständlich. Im Blut liegt die Halbwertszeit von Kininen unter 0,5 min, da sie durch die proteolytische Aktivität der Enzyme Kininase I (Carboxypeptidase N) und Kininase II (*Angiotensin-Converting Enzyme*, ACE) degradiert werden (SHEIKH & KAPLAN, 1986). Der Spiegel an freien BK-Molekülen im Blut ist dadurch unter normalen physiologischen Verhältnissen sehr niedrig. Es ist daher möglich, dass an der Oberfläche von Endothelzellen freigesetzte BK-Moleküle nicht in das zirkulierende Blut diffundieren, sondern direkt in der Nähe ihres Wirkungsortes auf Zelloberflächenstrukturen gebunden werden. Möglicherweise stellt dieses eine Art Schutzmechanismus dar, der eine schnelle Wirkung der freigesetzten BK-Moleküle sicherstellt. Eventuell erklärt dies auch, dass

innerhalb der ersten Minuten nach Zugabe von HAPB im RIA kein freies BK im Zellüberstand nachzuweisen ist. Zelloberflächen-gebundene BK-Moleküle diffundieren somit nicht mehr in den Überstand und werden im RIA nicht erfaßt. Nach dieser Theorie könnte das Ca^{2+} -Signal, welches nach der Behandlung von HUVECs mit HAPB (ohne Zugabe von exogenem HK) zu beobachten war, durch lokal in Rezeptornähe freigesetzte BK-Moleküle wenige Sekunden nach Beginn der Stimulation ausgelöst worden sein. Der erst nach längerer HAPB-Inkubation mögliche Nachweis an signifikanten BK-Mengen im RIA deutet auf eine langsame Akkumulation der Moleküle im Zellüberstand hin. Die für den RIA gewählten Versuchsbedingungen in Gegenwart des B2R-Antagonisten HOE140 und des ACE-Inhibitors Captopril könnten sich begünstigend auf diese Akkumulation auswirken. Während der ACE-Inhibitor die Degradation von Kininen verhindert, wird durch die Zugabe von HOE140 in den Versuchsansatz eine Rezeptorbindung von BK unterbunden. Eine BK-Inaktivierung sollte somit ausgeschlossen sein, und die freigesetzten BK-Moleküle sollten in den Überstand diffundieren, sofern sie nicht an andere Zelloberflächenstrukturen in der Nähe ihres Wirkungsortes binden.

Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich die im RIA ermittelte BK-Konzentration im Überstand im Verlauf der Inkubation mit HAPB nach 15 min auf 46 pM BK und nach 45 min nur noch auf 60 pM BK. Dieses könnte durch das Nachlassen der enzymatischen Aktivität von HAPB nach spätestens 20 min erklärt werden, welches zu einer Verlangsamung der BK-Bildung führt. Ausgehend von 10^5 HK-Bindestellen pro Zelle könnten durch die proteolytische Aktivität von HAPB insgesamt ca. 600 pM BK in den Zellüberstand freigesetzt werden, vorausgesetzt, an allen Bindestellen sind HK-Moleküle gebunden und alle BK-Moleküle diffundieren in den Überstand. Die tatsächlich im RIA ermittelten Werte entsprechen etwa 10 % dieser theoretisch möglichen Konzentration. Diese Werte liegen beide weit unter der in der Literatur von BUSSE UND LAMONTAGNE (1991) beschriebenen minimalen Konzentration von 3 nM BK, welche notwendig ist, um eine volle Aktivierung des B2R und damit eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 400-500 nM in humanen Endothelzellen auslösen zu können. Im Rahmen dieser Publikation wurde des Weiteren auch eine Konzentrationsabhängigkeit des BK-induzierten Signals nachgewiesen. So werden durch Stimulation mit 1 nM BK nur noch 250-300 nM intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen freigesetzt, während die durch 0,3 nM BK induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nahe der Basiskonzentration von ≤ 100 nM liegt (BUSSE & LAMONTAGNE, 1991). Es ist daher fraglich, ob eine Konzentration von 60 bzw. 600 pM BK überhaupt ausreicht, um ein meßbares Signal induzieren zu können. Im Falle der im eigenen Labor etablierten

HUVEC-Primärkultur wurde in Kontrollexperimenten mit einer BK-Konzentration unter 3 nM BK keine signifikante Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mehr beobachtet. Somit liegen die Ca^{2+} -Signale, die mit 60 und 600 pM BK induziert werden, vermutlich weit unter der Grenze der Nachweisbarkeit. Damit insgesamt 3 nM BK in den Überstand freigesetzt werden könnten, müssten zudem 5fach mehr HK-Moleküle auf der Zelloberfläche gebunden sein.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Menge an durch HABP freigesetzten BK-Molekülen im Zellüberstand wurde kürzlich von RENNÉ *et al.* (2003) vorgestellt. Die Autoren beschreiben in ihrer Arbeit, dass die Hauptbindestellen für HK-Moleküle auf Endothelzellen HSPGs sind. Die Komplexierung von HK mit Proteoglykanen der Zelloberfläche schützen die HK-Moleküle vor proteolytischer Spaltung während der Aktivierung der Kontaktphase. Durch diesen Mechanismus wird auch die Bildung von BK unterbunden. RENNÉ *et al.* bewiesen auch, dass erst die Freisetzung der HK-Moleküle durch die Spaltung der Proteoglykane infolge inflammatorischer Stimuli eine Proteolyse von HK und die damit verbundene BK-Bildung erlauben (RENNÉ *et al.*, 2003). Möglicherweise ist dies der Grund dafür, dass nur geringe BK-Mengen nach HABP-Inkubation im Zellüberstand nachzuweisen sind. Die Mehrheit der HUVEC-gebundenen HK-Moleküle könnte unter diesen Umständen nicht als Substrat fungieren und müsste erst in Lösung gebracht werden, um gespalten werden zu können. Dieses könnte auch begründen, dass die Induzierung einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch HABP in HUVECs bei einer großen Zahl der durchgeführten Messungen erst nach Zugabe von geringen Mengen HK (20 nM; entspricht ca. 1/35 der plasmatischen HK-Konzentration) in das Inkubationsmedium möglich war. Die Zugabe der geringen Mengen an exogenem HK gewährleistet somit die Reproduzierbarkeit der Signale. Grundsätzlich wurde jedoch auch ohne Zugabe von exogenem HK eine Ca^{2+} -Mobilisierung beobachtet, allerdings bei einer relativ geringen Anzahl der Messungen. In diesen Fällen scheinen die HK-Moleküle auf der Zelloberfläche von HUVECs für die proteolytische Spaltung durch HABP zugänglich zu sein. Da die hier beschriebenen Experimente mit HUVEC-Primärkulturen aus Nabelschnüren durchgeführt wurden, könnte hier die Gesamtkonstitution der Zellen eine Rolle spielen, die innerhalb der Kulturen sehr stark differieren kann. Sie hängt sehr stark vom Gesundheitszustand und der Medikation von Mutter und Kind vor und während der Geburt ab.

Wie die Literatur belegt, besteht grundsätzlich auch die Möglichkeit der direkten Aktivierung des B2R durch verschiedene Serinproteasen ohne die Mitwirkung von BK. Zu diesen Proteasen gehören Plasma- und Gewebekallikrein, Trypsin und Cathepsin G. In

CHO (*chinese hamster ovary*)-, MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-, HEK293 (*human embryonic kidney*)- und BPAE (*bovine pulmonary arterial endothelial*)-Zellen, die zuvor mit humaner B2R-cDNA stabil transfiziert wurden, konnten diese Proteasen den B2R direkt aktivieren und eine intrazelluläre Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen auslösen. Die direkte Aktivierung des B2R durch die genannten Proteasen wurde durch die Zugabe des B2R-Antagonisten HOE140 blockiert (HECQUET *et al.*, 2000). Es kann im Falle von HABP jedoch ausgeschlossen werden, dass die Protease eine direkte Aktivierung des B2R in HUVECs induziert, da die HABP-vermittelten beobachteten Ca^{2+} -Signale eine starke Abhängigkeit von Kininogen zeigen, und eine Aktivierung des B2R in jedem Fall auch ohne die Zugabe von exogenem Kininogen möglich sein müsste.

3.2 FGFR1-vermittelte Signaltransduktion in Endothelzellen

Neben der Aktivierung von HUVECs durch die Freisetzung von BK induziert HABP in diesem Zelltyp außerdem eine Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges. Rezeptor-Inhibitionsstudien belegen, dass die durch HABP induzierte MAPK-Aktivierung über den FGFR1 vermittelt wird und völlig unabhängig von der B2R-vermittelten Aktivierung ist. In der Literatur ist bisher keine direkte Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren durch Proteasen oder proteolytische Spaltung beschrieben worden, sodass eine direkte Aktivierung von FGFR1 durch HABP ausgeschlossen werden sollte. Aufgrund zahlreicher Publikationen, die die proteolytische Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der ECM beschreiben, kann als möglicher Aktivierungsmechanismus eine HABP-vermittelte proteolytische Freisetzung von ECM-gebundenem FGF in Erwägung gezogen werden, die schließlich durch Bindung des Wachstumsfaktors an den FGFR1 und anschließende Rezeptoraktivierung eine Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges hervorrufen kann (siehe Abb. 3.1).

Zur Familie der FGFs gehören 20 verschiedenen Mitglieder, die mit FGF-1 bis FGF-20 bezeichnet werden, und auf zahlreiche Zelltypen eine mitogene, chemotaktische und angiogene Wirkung haben. Für das Wachstum und die Entwicklung von Endothelzellen spielen FGF-1 (saurer FGF; aFGF) und FGF-2 (basischer FGF; bFGF), die beide über den FGFR1 agieren, sehr wichtige Rollen (POWERS *et al.*, 2000). Als essentieller endothelialer Angiogenesefaktor fungiert jedoch nur bFGF. Er wird in Endothelzellen synthetisiert und durch Komplexbildung mit HSPGs der subendothelialen ECM, wie z. B. Perlecan und Syndecan, auf der Zelloberfläche gespeichert (VLODAVSKY *et al.*, 1987; FOLKMAN *et al.*, 1988). Die Bindung der bFGF-Moleküle an HSPGs dient dabei auch dem Schutz vor

proteolytischem Abbau der Wachstumsfaktoren, sodass die Matrix auf diese Weise einen Vorrat an Wachstumsfaktormolekülen bereitstellt (SAKSELA *et al.*, 1988). Das Core-Protein der Zell-assoziierten HSPGs reagiert sehr sensitiv gegenüber proteolytischer Degradation durch Heparansulfat-abbauende Enzyme, wie Heparanasen, und die Proteasen Plasmin, Thrombin, Collagenase und Stromelysin (BASHKIN *et al.*, 1989; ISHAI-MICHAELI *et al.*, 1990; SAKSELA & RIFKIN, 1990; BENEZRA *et al.*, 1993; WHITELOCK *et al.*, 1996). Auf diese Weise freigesetzte bFGF-Moleküle, die an Heparansulfat-Seitenketten des geschnittenen Core-Proteins gebunden sind, können dann durch die Bindung an den FGFR1 in einem trimeren Komplex aus bFGF-FGFR1-HSPG zur Rezeptor-Dimerisierung und anschließenden Autoaktivierung führen (POWERS *et al.*, 2000). Generell können freie FGF-Moleküle keine Wechselwirkung mit dem FGFR auf der Zelloberfläche eingehen, sodass Zellen ohne heparansulfathaltige Zelloberflächenproteoglykane nicht auf FGF reagieren. Erst die Bindung des FGF an Heparansulfatketten bewirkt eine Konformationsänderung des Moleküls, wonach FGF an seine spezifischen Rezeptoren binden kann. Die HSPGs auf den Zellen fungieren somit als Korezeptoren. Im Anschluß an die Rezeptoraktivierung kommt es im Verlauf der Signalweiterleitung im Cytoplasma zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden wie der ERK1/2-abhängigen MAPK-Kaskade, deren Ziel die Regulation der Zellproliferation ist.

Ein ähnlicher Wachstumsfaktor-freisetzender Effekt wurde auch für den Gerinnungsfaktor Xa publiziert. In vaskulären glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) bewirkt FXa durch seine Serinproteaseaktivität die autokrine Freisetzung von PDGF, welches über den PDGF-Rezeptor den MAPK-Signalweg aktiviert und die DNA-Synthese und Zellproliferation stimuliert. Die Autoren belegten anhand von Studien in Gegenwart neutralisierender PDGF-Antikörper, dass die FXa-vermittelte mitogene Wirkung auf VSMCs durch PDGF selbst und nicht durch FXa induziert wird (KO *et al.*, 1996; HERBERT *et al.*, 1998).

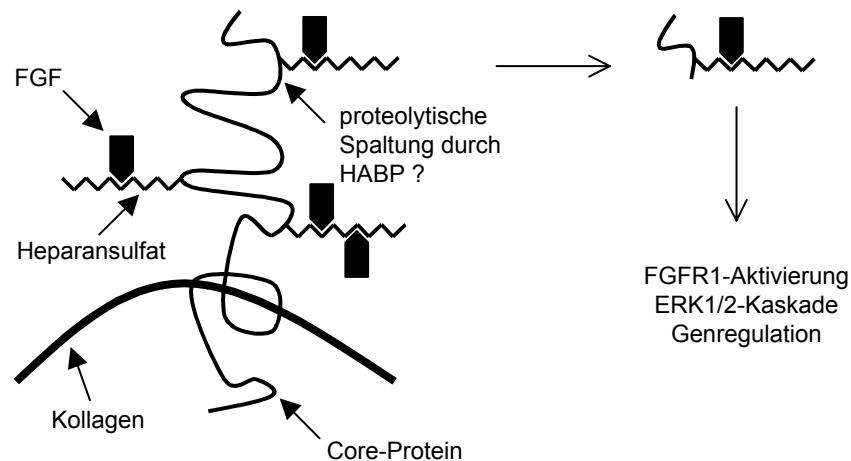


Abbildung 3.1: Möglicher Mechanismus für die Mobilisierung von FGF aus ECM-Reservoirs durch HABP (modifiziert nach POWERS *et al.*, 2000). Durch die proteolytische Spaltung der Core-Proteine der Zell-assoziierten HSPGs kann HABP möglicherweise FGF-Moleküle freisetzen, die an Heparansulfat-Seitenketten des geschnittenen Core-Proteins gebunden sind. Diese FGF-Moleküle können dann die Aktivierung des FGFR1 und des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges auslösen und damit genregulatorisch wirken.

Signaltransduktionsversuche in Gegenwart von aFGF- bzw. bFGF-neutralisierenden Antikörpern gaben Hinweise auf eine ähnliche FGF-freisetzende Rolle von HABP, wie sie auch schon für die oben genannten Proteasen beschrieben wurde. Die HABP-induzierte Aktivierung von ERK1/2 wurde durch den Einsatz dieser Antikörper vollständig unterdrückt. Die proteolytische Freisetzung von ECM-gebundenen FGF-Molekülen als Schlüsselauslöser der intrazellulären Signaltransduktion und damit der Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges wird aus unserer Sicht durch HABP induziert. Weiterführende Studien zum Nachweis von FGF, welches möglicherweise durch die proteolytische Aktivität von HABP aus der subendothelialen ECM freigesetzt wird, in konditioniertem Medium, sind jedoch notwendig, um diese Hypothese bestätigen und Aufschluss über den genauen HABP-induzierten FGFR1-vermittelten Aktivierungsmechanismus geben zu können.

Ausgehend von der Annahme, dass HABP ECM-gebundene FGF-Moleküle freisetzt und diese über die Aktivierung des FGFR1 eine Phosphorylierung von ERK1/2 auslösen, war es von Interesse, die Signalstärke des HABP-vermittelten ERK1/2-Signals mit der des aFGF- bzw. bFGF-vermittelten zu vergleichen. Gegenüber der Stimulation mit a-FGF bzw. bFGF resultierte aus der Stimulation mit HABP ein relativ schwaches Phosphorylierungssignal. Im Falle von aFGF entspricht die Signalstärke des mit 125 nM HABP induzierten Signals der Signalstärke, die man mit ~ 0,15 ng/mL aFGF erzielen kann. Für bFGF liegt diese Konzentration zwischen 0,3 und 0,6 ng/mL. Wie aus diesem Ergebnis geschlossen

werden kann, werden durch HABP verhältnismäßig wenige FGF-Moleküle freigesetzt, welche die ERK1/2-Aktivierung auslösen können. Dieses scheint auch ein Grund für den sehr geringen Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 zu sein. Eine Erhöhung der eingesetzten HABP-Konzentration hatte keinen Einfluß auf die Signalstärke von phosphoryliertem ERK1/2.

Zur Aufklärung des für die HABP-induzierte FGFR1-abhängige Signaltransduktion verantwortlichen Aktivierungsmechanismus könnten Untersuchungen in Gegenwart eines FGFR1-Antagonisten beitragen. Ein solcher Antagonist könnte die Interaktion des Liganden FGF mit seinem Rezeptor auf der extrazellulären Seite verhindern und die durch die Liganden-Rezeptor-Bindung ausgelöste Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der cytoplasmatischen Rezeptor-Domäne könnte infolgedessen nicht mehr stattfinden. Die Signalweiterleitung wäre damit blockiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit einem kommerziell erhältlichen FGFR1-Antagonisten, einem Peptid aus der Sequenz des bFGF-Moleküls (YAYON *et al.*, 1993), konnten nicht ausgewertet werden, da der Antagonist nicht funktionsfähig war und in Kontrollexperimenten die mit bFGF induzierte Aktivierung von ERK1/2 nicht inhibierte. Mit der Identifizierung eines Porphyrin-Analogons (5, 10, 15, 20-tetrakis (methyl-4-pyridyl)-21*H*, 23*H*-porphyrine tetra-*p*-tosylate salt; TMPP), einem neuartigen Antagonisten der FGF- und VEGF-Rezeptor-Bindung, wurde kürzlich eine neue Methode zur Inhibition von Zellproliferation, Tumorprogression und Metastasenbildung in humanen Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben (AVIEZER *et al.*, 2000; SEGEV *et al.*, 2002). Im Falle der durch HABP ausgelösten Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges über den FGFR1 könnte die Verwendung eines solchen Rezeptor-Antagonisten in weiterführenden Studien Aufschluss darüber geben, ob das Signal direkt durch die Bindung von FGF an den Rezeptor auf der extrazellulären Seite ausgelöst wird. Das Ergebnis der Studien in Gegenwart der neutralisierenden FGF-Antikörper könnte auf diese Weise untermauert und bestätigt werden.

In zahlreichen Publikationen zu Aktivierungsmechanismen von Wachstumsfaktorrezeptoren wurde die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) auch durch die Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) nachgewiesen. Auf diese Weise wird eine Verbindung zwischen GPCR- und RTK-Signaltransduktionswegen hergestellt. Beispielsweise können der EGF-Rezeptor (EGFR), der PDGF-Rezeptor und der FGFR1 durch eine GPCR-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung (Transaktivierung) der cytoplasmatischen Domäne aktiviert werden, wodurch Wachstumsfaktorrezeptor-

abhängige Signalwege induziert werden (DAUB *et al.*, 1996; DAUB *et al.*, 1997; HERRLICH *et al.*, 1998; BELCHEVA *et al.*, 2002). In Bezug auf HABP ist nicht ganz auszuschließen, dass möglicherweise auch eine HABP-induzierte Transaktivierung des FGFR1 durch einen bisher noch nicht identifizierten Rezeptor zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Die durchgeführten Signaltransduktionsstudien in Gegenwart des FGFR1-Inhibitors SU5402 konnten nämlich nur einen Hinweis darauf geben, dass der FGFR1 die HABP-induzierte ERK1/2-Aktivierung vermittelt. Die Frage der Transaktivierung konnte dieses Experiment jedoch nicht klären. Der FGFR1-Inhibitor SU5402 gehört zu einer neuartigen Familie von synthetischen Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren auf Indolinone-Basis und hemmt die Kinase-Aktivität des FGFR1 durch Bindung der ATP-Bindestelle (MOHAMMADI *et al.*, 1997). Die infolge einer Rezeptor-Aktivierung stattfindende Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der cytoplasmatischen Domäne wird auf diese Weise inhibiert, sodass die Signalweiterleitung unterbrochen ist. Eine Liganden-unabhängige Aktivierung des FGFR1 über eine intrazelluläre Transaktivierung kann durch den Einsatz von SU5402 dennoch nicht festgestellt werden, da sowohl extrazelluläre Signale über den Liganden als auch intrazelluläre Signale über Transaktivierung nicht weitergeleitet werden können. Nur in Gegenwart eines Rezeptor-Antagonisten, der die Liganden-Bindestelle blockiert, ist die Überprüfung einer Transaktivierung möglich, da in diesem Falle trotzdem eine ERK1/2-Aktivierung nachzuweisen sein muß.

Die FGFR1-vermittelte Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges über die Freisetzung von FGF lässt vermuten, dass HABP infolgedessen auch auf das Zellwachstum von Endothelzellen einen Einfluß ausübt. Auch die FGFR1-abhängige über den ERK1/2-Signalweg verlaufende Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Myc durch HABP deutet auf eine mögliche mitogene Wirkung der Plasmaprotease hin. Aktiviertes c-Myc induziert in normal proliferierenden Zellen im Zellkern die Expression Zellzyklus-regulierender Gene und kontrolliert somit das Zellwachstum und die Proliferation. Gleichzeitig führt dies zu einer Inhibition der Apoptosetranskription. Als Protoonkogen ist c-Myc aber auch an der Entstehung von Tumorzellen beteiligt. Das onkogene Potential von c-Myc kann durch chromosomale Translokation, retrovirale Insertion oder Gen-amplifikation aktiviert werden. Zu den Zielgenen von c-Myc gehört unter anderem auch das Gen des Translationsfaktors eIF-4E (BOYD & FARNHAM, 1999; PELENGARIS *et al.*, 2002). Im Rahmen der Signaltransduktionsstudien wurde auch eine HABP-vermittelte Aktivierung von eIF-4E beobachtet. Über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression und anschließenden Aktivierung von eIF-4E und der Aktivierung von c-Myc

durch HABP gibt es jedoch keine Hinweise. Welche Gene genau durch c-Myc im Zuge der HABP-Stimulation transkribiert werden und ob die synthetisierten Proteine einen Einfluß auf die Proliferation von Endothelzellen haben können, kann nur durch Expressionsanalysen geklärt werden.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe zum Einfluß von HABP auf die Adhäsion und bFGF-abhängige Proliferation von HUVECs zeigten ein Ergebnis, das der oben dargestellten Theorie eines proliferativen Effektes von HABP durch die Freisetzung von FGF widerspricht. Sowohl in Adhäsions- als auch in Proliferationsstudien mit humanen Endothelzellen wurde durch HABP eine Hemmung der Anheftung und des Zellwachstums hervorgerufen. Der antiproliferative Effekt wird vermutlich durch die HABP-vermittelte proteolytische Degradation des für HUVECs essentiellen Wachstumsfaktors bFGF verursacht. Die Spaltung von bFGF durch HABP wurde durch elektrophoretische Untersuchungen bewiesen. Der antiadhäsive Einfluß kann jedoch nicht durch das Fehlen des Wachstumsfaktors erklärt werden, da dieser nicht für die Adhäsion notwendig ist. Ursache hierfür könnte eine durch HABP verursachte Strukturveränderung von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche sein. Auch die Resultate kürzlich durchgeführter Migrationsstudien, in denen HABP eine Inhibition der Migration von Endothelzellen verursacht (pers. Mitteilung von M. Etscheid), deuten auf eine HABP-vermittelte Veränderung von Molekülen hin, die für die Adhäsion und die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte notwendig sind (ETSCHEID *et al.*, 2004). HABP scheint jedoch in Bezug auf das FGF-induzierte Wachstum verschiedener Zelltypen eine duale Rolle zu spielen. Proliferationsstudien mit humanen Lungenfibroblasten (MRC-5) resultierten in einem durch HABP induzierten Anstieg des Zellwachstums über vier Tage hinweg. Kurzzeitiger Effektor könnte hier möglicherweise die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der ECM sein. Dennoch kann HABP hier auch der Auslöser für eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren sein, was den längerfristigen über mehrere Tage andauernden proliferativen Effekt von HABP auf Fibroblasten erklären könnte. Ebenso wie in HUVECs induziert HABP auch in Fibroblasten eine FGFR1-vermittelte Aktivierung des ERK1/2-abhängigen MAPK-Signalweges (ETSCHEID *et al.*, 2003a; ETSCHIED *et al.*, 2003b). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der kurzzeitigen Aktivierung des MAPK-Signalweges und den langzeitigen sowohl negativen als auch positiven Proliferations-effekten in beiden Zelllinien muß in weiteren Studien untersucht werden.

3.3 Regulation von HABP im Plasma

HABP zirkuliert ebenso wie die Gerinnungsfaktoren des Hämostasesystems als inaktives einkettiges Zymogen im Plasma. In *in vitro*-Experimenten wird HABP sehr schnell infolge eines intermolekularen Autoaktivierungsmechanismus durch einen singulären Schnitt im Molekül zwischen R₂₉₀ und I₂₉₁ in ein zweikettiges aktives Enzym umgewandelt. Geladene Moleküle wie Poly-L-Lysin, Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane (ETSCHIED *et al.*, 2000; KANNEMEIER *et al.*, 2001) und RNA (NAKAZAWA *et al.*, 2003a; NAKAZAWA *et al.*, 2003b) führen zu einer Beschleunigung der Autoaktivierung.

Im Plasma wird die Aktivität der an der Blutgerinnungskaskade und Fibrinolyse beteiligten Proteasen durch eine Reihe von Inhibitoren reguliert, wodurch sich der hämostatische Prozess in einem ständigen Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung befindet. Beispielsweise wird Thrombin außerhalb des Bereichs einer Gefäßverletzung schnell durch die Komplexbildung mit ATIII unter Blockierung des aktiven Zentrums gehemmt (ROSENBERG & DAMUS, 1973; GRIFFITH, 1986). Die inhibierende Wirkung von ATIII wird durch Heparin, einem sulfatierten Glykosaminoglykan, vervielfacht, da es die Komplexbildung von Thrombin und ATIII beschleunigt (JORDAN *et al.*, 1980). Darüber hinaus bindet und inhibiert ATIII auch andere an der Gerinnung beteiligte Serinproteasen wie FIXa, FXa und FXIa. Weitere an der Regulation der Hämostase beteiligte Protease-Inhibitoren sind TFPI, Protein C und S, α_2 -AP, Heparin-Kofaktor II, Protein C-Inhibitor, PAI-1 und PAI-2.

Ebenso wie im Falle anderer Plasmaproteasen ist eine strenge Regulation von HABP im Plasma sehr wichtig, besonders weil die Protease ein hohes Potential zur Autoaktivierung besitzt. Bisher sind jedoch noch keine durch HABP verursachten Fehlfunktionen der Hämostase bekannt, was auf eine Kontrolle der Aktivität der Plasmaprotease durch plasmatische Inhibitoren hindeutet. Basierend auf Studien zum Inhibitorprofil von HABP können zahlreiche plasmatische Serpine, nämlich der C1-INH, α_2 -AP, ATIII/Heparin und PAI-1, sowie der Kunitz-Typ-Inhibitor Inter- α -Inhibitor als potentielle physiologische Inhibitoren der Plasmaprotease in Frage kommen (ETSCHIED *et al.*, 2002b). PAI-1 ist aufgrund seiner sehr geringen Konzentration von 0,4 nM im Plasma jedoch nur *in vitro* ein guter Inhibitor und hat unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluß auf die Aktivität von HABP, da alle anderen untersuchten Inhibitoren im Plasma in wesentlich höherer Konzentration (> 1 μ M) vorkommen. Durch die schnelle Hemmung von HABP durch zahlreiche plasmatische Inhibitoren kann eine Auto-

aktivierung der Protease und die Beeinflussung des Hämostasesystems durch das aktive Enzym vermutlich ausgeschlossen werden.

Außer durch die Hemmung durch plasmatische Inhibitoren kann die Regulation der Aktivität von Plasmaproteasen auch auf zellulärer Basis erfolgen. Ein typischer zellulärer Regulationsmechanismus ist die von Blutgefäßzellen vermittelte Entfernung von Proteasen aus dem zirkulierenden Blut durch Endocytose. Dieser so genannte Klärungs (*clearance*)-Mechanismus reguliert die extrazelluläre Konzentration der Plasmaproteasen und deren biologische Aktivität im vaskulären System.

Um zu überprüfen, ob die Aktivität von HABP einem ähnlichen Regulationsmechanismus unterliegt, wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt, deren Ergebnisse veranschaulichen, dass HABP in Endothelzellen in im Cytoplasma lokalisierten lysosomalen Vesikeln nachzuweisen ist. Die Verwendung eines spezifischen Lysosomenindikators bestätigte, dass es sich bei den cytoplasmatischen Vesikeln tatsächlich um Lysosomen handelt. Auch ist die Bildung der Lysosomen HABP-abhängig, da sie in der parallel durchgeführten Kontrolle ohne HABP nicht zu beobachten war. Über den Mechanismus der Internalisierung von HABP in HUVECs gibt es zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch keine genauen Erkenntnisse. Für zahlreiche plasmatische Serinproteasen des Hämostasesystems ist in der Literatur eine Regulation der proteolytischen Aktivität über Endocytose beschrieben worden. Vermutlich erfolgt die Internalisierung von HABP in HUVECs über einen ähnlichen Regulationsmechanismus, durch den die Protease unter physiologischen Bedingungen aus dem vaskulären System entfernt wird.

Die Regulation von Serinprotease-katalysierten extrazellulären proteolytischen Prozessen setzt die Mitwirkung von Serpinen voraus. Denn der am weitesten verbreitete zelluläre Regulationsmechanismus von plasmatischen Serinproteasen ist die rezeptorvermittelte Endocytose von Serpin-Enzym-Komplexen. Hierbei kommt es an Zelloberflächenstrukturen, die in direktem Kontakt mit dem Plasma stehen, zunächst zu einer Komplexbildung der zu entfernenden Protease mit einem spezifischen Inhibitor. Der entstandene Serpin-Enzym-Komplex wird anschließend sehr schnell über einen zellulären Rezeptor internalisiert, damit aus dem zirkulierenden Blutkreislauf entfernt und im Zellinneren durch proteolytische Degradation in Lysosomen abgebaut. Dieser Mechanismus zur Entfernung von Proteasen aus dem zirkulierenden Blut ist für viele vaskuläre Membranrezeptoren charakteristisch.

Die Rezeptoren der *low density lipoprotein receptor* (LDLR)-Superfamilie wie der LDLR und das *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) stellen sehr

bekannte Beispiele für Zelloberflächenrezeptoren dar, die Serinprotease-Serpin-Komplexe mit hoher Affinität binden und deren Endocytose und lysosomale Degradation vermitteln. Das LRP wird in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert und ist in sehr großer Anzahl in der Leber vorhanden (MOESTRUP *et al.*, 1992). Als ein multifunktionaler Endocytose-Rezeptor ist das LRP für die Bindung und Internalisierung eines breiten Spektrums von Liganden verantwortlich und spielt eine Schlüsselrolle beim Lipoprotein-Stoffwechsel und der Regulation von Proteasen. Proteasen und Moleküle, die an der Regulation proteolytischer Aktivität beteiligt sind, umfassen die größte Gruppe der mehr als 30 LRP-bindenden bekannten Liganden (HERZ & STRICKLAND, 2001). Beispielsweise werden die Plasminogen-Aktivatoren uPA und tPA im Komplex mit ihrem physiologischen Inhibitor PAI-1 über den Multiligandenrezeptor α_2 MR/LRP endocytiert. Ebenso kann der uPA/PAI-1-Komplex an den uPAR binden und durch die kooperative Wechselwirkung mit dem Multiligandenrezeptor α_2 MR/LRP internalisiert und lysosomalen Degradationsprozessen zugeführt werden. Sowohl uPAR als auch der α_2 MR/LRP können dann wieder an der Zelloberfläche erscheinen (BLASI, 1994; CAMANI & KRUTHOF, 1994; ANDREASEN *et al.*, 1994). Außerdem werden α_2 M/Protease-Komplexe (ASHCOM *et al.*, 1990) und, neben anderen Serpin-Enzym-Komplexen, Thrombin/Heparin Kofaktor II, Trypsin/ α_1 AT, Elastase/ α_1 -Antitrypsin (α_1 AT) und Thrombin/ATIII von LRP gebunden und anschließend dem *clearance*-Prozess unterzogen (KOUNNAS *et al.*, 1996). Aufgrund seiner Fähigkeit, sehr viele verschiedene Serpin-Enzym-Komplexe binden und internalisieren zu können, kann man darüber spekulieren, ob das LRP in HUVECs eventuell auch für die Internalisierung von HABP im Komplex mit einem plasmatischen Inhibitor verantwortlich ist.

Während das LRP auch nicht-komplexierte und -inhibierte Liganden wie z. B. pro-uPA und FVIII binden und internalisieren kann, wurde für den uPAR ein ganz neuartiger Regulationsmechanismus beschrieben. Im Gegensatz zu Rezeptor-gebundenem uPA und pro-uPA, können nur enzymatisch inaktive uPA/PAI-1- und uPA/Protease-Nexin-1 (PN1)-Komplexe internalisiert und in Lysosomen degradiert werden. Die Zellen sind damit in der Lage, nicht nur die Menge, sondern auch die Lokalisation der uPA-Aktivität auf der Zelloberfläche zu regulieren. Außerdem ist für die Internalisierung von uPA/PAI-1- und uPA/PN1-Komplexen das zur LDLR-Superfamilie gehörende LRP als Transmembran-Partner notwendig. Nach der endosomalen und lysosomalen Degradation von uPA wird der uPAR danach einem Recycling-Prozess unterzogen und als freies Rezeptormolekül wieder an die Zelloberfläche transportiert (OLSON *et al.*, 1992; NYKJAER *et al.*, 1997).

Welcher Rezeptor konkret für die Internalisierung von HABP in HUVECs verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Auch die Frage, ob auch im Falle von HABP der Endocytose eine Komplexbildung mit einem Serpin vorausgeht, wie es auch bei anderen Serinproteasen beobachtet wurde, muß in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Von den bereits getesteten plasmatischen Serpinen α_2 AP, C1-INH, ATIII/Heparin und PAI-1, die *in vitro* sowohl eine gute Inhibition von HABP als auch eine Komplexbildung mit der Protease zeigen (ETSCHIED *et al.*, 2002b), könnte möglicherweise ein Inhibitor im Komplex mit HABP von Endothelzellen internalisiert werden. Des Weiteren waren die Ergebnisse der Immunfluoreszenzexperimente stark Serum-abhängig. Eine Internalisierung von HABP fand nur bei Zellen statt, die in Gegenwart von Serum herangezogen wurden (nicht gezeigt). Dieses deutet darauf hin, dass das Serum vermutlich die Quelle für den zur Internalisierung notwendigen Inhibitor darstellt. Im Serum enthaltene Inhibitoren könnten somit an Zelloberflächenstrukturen binden und mit HABP einen Komplex eingehen, der anschließend endocytiert wird.

Die *clearance* von Plasmaproteasen aus dem zirkulierenden Blut über Endocytose ist ein Prozess, der im menschlichen Körper vorwiegend in den Zellen der Leber wie Hepatocyten und Leberendothelzellen stattfindet. Als zentraler Ort des menschlichen Intermediärstoffwechsels greift die Leber in den Stoffwechsel praktisch aller Metabolit-Gruppen wie Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren und Plasmaproteine ein. Ihre Leistungen dienen in erster Linie dem Ziel, die Plasmakonzentrationen dieser Stoffe konstant zu halten (Homöostase). Als Modellsystem für die Untersuchung der Internalisierung von plasmatischen Proteasen und Proteinen durch Endothelzellen werden häufig HUVECs verwendet, da Nabelschnüre zur Präparation von Primärkulturen wesentlich einfacher zu erhältlich sind als eine Leber. Zudem stehen die Zellen der Nabelschnurvene in direktem Kontakt zum fetalen Blut, das von der Plazenta in den Fetus geführt wird, und reagieren möglicherweise sensibler als die Zellen der Leber eines Adulten. Somit übernehmen die HUVECs mit der Endocytose von Plasmamolekülen eine Art Schutzmechanismus, durch den der Kontakt des Embryos mit bestimmten Stoffen im Blut verhindert wird. In Bezug auf die zelluläre Funktion von HABP kann die beobachtete Internalisierung auch ein Hinweis auf eine mögliche zellregulatorische Funktion der Protease sein, da die Endothelzellen als Reaktion auf die proteolytische Wirkung von HABP und den daraus resultierenden zellulären Stress über die Endocytose mit Gegenregulation reagieren. Ein weiterer Hinweis dafür, dass der Endocytose von HABP durch HUVECs durchaus eine physiologische Bedeutung zugrunde liegt, ist die Tatsache,

dass in humanen Lungenfibroblasten (MRC-5) keine Internalisierung zu beobachten ist (eigene Befunde). Fibroblasten haben im Gewebeverband keinen direkten Kontakt zum Blut, wodurch eine Endocytose von Plasmaproteasen aus physiologischer Sicht aufgrund des Gefäßwandaufbaus nicht möglich ist.

Obwohl HABP eine hohe Affinität zu Hyaluronsäure, Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen und damit auch zu Komponenten der ECM besitzt, wurde in den Immunfluoreszenzstudien, die ohne Membranpermeabilisierung durchgeführt wurden, keine Bindung der Protease auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Ein Grund hierfür könnte eventuell eine zu schwache Bindung von HABP an die Zelloberflächenmoleküle sein, die der immunologischen Nachweismethode nicht standhält. Im Hinblick auf die beobachtete Internalisierung von HABP, die vermutlich über rezeptorvermittelte Endocytose verläuft, wäre eine Bindung an einen Rezeptor jedoch naheliegend. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Internalisierung von HABP sehr schnell abläuft und man die Protease deswegen nur im Cytoplasma, und nicht auf der Zelloberfläche nachweisen kann. Ein direkter, durch HABP aktivierbarer Rezeptor wurde im Rahmen der Signaltransduktionsstudien dieser Arbeit nicht identifiziert, da HABP HUVECs über die sekundären Signale BK und FGF und deren endotheliale Rezeptoren aktiviert. Dieses kann auch einen Hinweis darauf geben, dass HABP auf der Oberfläche von Endothelzellen immunologisch nicht nachzuweisen ist.

3.4 Potentielle physiologische Funktion von HABP im Gefäßsystem

Zur biologischen Funktion von HABP gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch relativ wenige Informationen. Bezüglich des Einflusses von HABP auf die Hämostase deuten die Beobachtungen verschiedener prokoagulatorischer und profibrinolytischer Eigenschaften von HABP jedoch darauf hin, dass es sich um ein Enzym mit einer dualen Rolle in Gerinnung und Fibrinolyse handelt. Zum einen kann HABP unabhängig von TF FVII aktivieren, was unter physiologischen Bedingungen zu einer Aktivierung der extrinsischen Gerinnung führen kann (RÖMISCH *et al.*, 1999b). Zum anderen ist HABP in der Lage, die Zymogene der Plasminogen-Aktivatoren uPA und tPA durch Spaltung in die aktive Form zu überführen, wodurch es im Plasma zu einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems kommen kann (RÖMISCH *et al.*, 1999a). Des Weiteren kann HABP durch die Spaltung und Aktivierung von HK unter Freisetzung von HKa und BK möglicherweise die Aktivierung des Kontaktphasensystems der intrinsischen Gerinnung herbeiführen (ETSCHEID *et al.*, 2002a). Durch die Spaltung und Inaktivierung der Kofaktoren FV und FVIII kann HABP

aber auch negative Effekte auf die Gerinnung ausüben und antikoagulatorisch wirken (siehe Abb. 1.6).

Wie aus den hier vorgestellten Resultaten hervorgeht, übt HABP nicht nur auf die Hämostase, sondern auch auf die das Blutgefäßsystem auskleidenden Zellen, das Endothel, einen aktivierenden Einfluß aus. Durch die Freisetzung von Mediatoren, wie BK und FGF, kann HABP indirekt über die Aktivierung von Endothelzellen (patho-)physiologische Prozesse beeinflussen. Die Plasmaprotease besitzt somit neben den oben aufgeführten hämostatischen Funktionen auch zellregulatorische Eigenschaften.

So kann die HABP-vermittelte Freisetzung von BK aus HK und die damit verbundene Aktivierung von Endothelzellen die Steuerung wichtiger vaskulärer Prozesse zur Folge haben. Unter normalen physiologischen Bedingungen werden Kinine bei Gewebsverletzungen und Entzündungen sowie bei der intrinsischen Blutgerinnung während der Aktivierung des Kontaktphasensystems freigesetzt. Die physiologische und pathologische Bedeutung der Bradykininwirkungen *in vivo* ist sehr vielfältig. Durch Kontraktion der Endothelzellen im Venolenbereich trägt BK zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität bei. Außerdem lösen Kinine durch Vasodilatation eine Blutdrucksenkung aus. An glatter Muskulatur hat BK sowohl kontrahierende als auch relaxierende Wirkungen. Des Weiteren hat man BK eine Bedeutung für die Schmerzentstehung, beschleunigte Wundheilung und Ödembildung zugesprochen (BHOOLA *et al.*, 1992; FORTH *et al.*, 1996; COLMAN & SCHMAIER, 1997; PSCHYREMBEL, 2002). Im Blut liegt die Halbwertszeit von Kininen unter 30 s (MCCARTHY *et al.*, 1965). Wie bereits erwähnt, sind für die Kininspaltung vor allem zwei Enzyme verantwortlich, die Kininase I und die Kininase II (SHEIKH & KAPLAN, 1986). Infolge der Kininaseaktivität ist der Kininspiegel unter normalen Verhältnissen gering (0,05-0,2 ng/mL). Die Wirkung der Kininase I setzt am C-terminalen Ende der Kinine an, wo sie Arginin abspaltet, wodurch desArg⁹-BK entsteht. Die Kininase II, eine Peptidyl-Dipeptidase, spaltet am C-terminalen Ende Phenyl-Arginin ab. Sie ist vor allem an den Endothelzellen lokalisiert und bewirkt den Bradykininabbau während der Lungenpassage. Sie ist auch verantwortlich für die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II und daher der Angriffspunkt für die antihypertensiv wirkenden ACE-Hemmer (FORTH *et al.*, 1996). Die Bradykininwirkung ist an B1- und B2-Rezeptoren (B1R u. B2R) gekoppelt, die zur Familie der GPCRs gehören (REGOLI & BARABÉ, 1980). Die B1Rs, die vor allem infolge einer Gewebsschädigung gebildet werden, und deren Stimulation Arterien- und Venenkonstriktion bewirkt, werden durch desArg⁹-BK aktiviert (MCLEAN *et al.*, 2000). Die B2Rs, deren Agonisten die BK-Moleküle sind, werden in den

meisten Geweben, so auch im Endothel, konstitutiv exprimiert. Mit der Aktivierung von BK-Rezeptoren sind über die Stimulation intrazellulärer Signalwege die Bildung von Prostacyclin, Superoxid und NO sowie die Freisetzung von tPA verbunden (LÜCKHOFF *et al.*, 1988; HALL, 1997; KAPLAN *et al.*, 1998; MARCEAU & BACHVAROV, 1998).

Aufgrund der sehr schnellen Degradation und Inaktivierung von BK durch die Kininasen I und II unterliegt die physiologische Wirkung von BK einer strengen Kontrolle. Es ist daher fraglich, ob durch HABP freigesetztes BK im menschlichen Körper tatsächlich eine Verschiebung der physiologischen BK-Konzentration verursachen und damit die Wirkungsweise des Peptids verstärken kann. Hinzu kommt, dass HABP durch verschiedene plasmatische Inhibitoren, wie beispielsweise durch den C1-INH in seiner enzymatischen Aktivität schnell gehemmt werden kann.

Im Falle eines angeborenen C1-INH-Mangels könnte sich eine Verschiebung des Konzentrationsgleichgewichts hin zu einem erhöhten BK-Spiegel im Körper hingegen problematisch auswirken. Der C1-INH ist der wichtigste Inhibitor der Kontaktaktivierung und des Komplementsystems (Teil des Immunsystems). Er inhibiert im Rahmen der intrinsischen Gerinnung FXIIa und Kallikrein und kontrolliert so die damit verbundene Freisetzung von BK während der Aktivierung des Kontaktphasensystems. Die physiologische Bedeutung des C1-INH liegt damit vorwiegend in der Regulation der Aktivierungsphase des Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-Systems. Wie bereits erwähnt, ist der C1-INH aber auch ein starker physiologischer Inhibitor für HABP, der die Kallikrein-ähnlichen Eigenschaften der Protease hemmen kann. Der genetisch bedingte Mangel an C1-INH wird autosomal dominant vererbt und verursacht eine seltene Erkrankung, das Hereditäre Angioödem (HAE) (LANDERMAN, 1962; DONALDSON & EVANS, 1963; SCHAPIRA *et al.*, 1983; CUGNO *et al.*, 1993). Ursache der klinischen Symptomatik bei HAE ist, dass es aufgrund des Mangels oder völligen Fehlens der C1-INH-Aktivität zu einer unkontrollierten Aktivierung des Kontaktphasen- und Komplementsystems und infolgedessen zur vermehrten Bildung von BK und C2-Kinin kommt. Diese wiederum lösen eine verstärkte Gefäßpermeabilität und Ödembildung aus. Das klinische Bild des HAE ist charakterisiert durch akut auftretende Schwellungen der Haut und Schleimhäute, häufig lokalisiert an Gesicht, Hals und Extremitäten. Die gefährlichste und lebensbedrohlichste Form des Angioödems stellt die Beteiligung des Larynx dar, an der mehr als 30 % der betroffenen Patienten durch unkontrollierte Erstickenfallsfälle sterben (MATTHIAS, 1996; KREUZ *et al.*, 1998; HACK & EISELE, 1998). Es ist zum jetzigen Zeitpunkt noch fraglich, inwieweit HABP bei einem C1-INH-Mangel

im Plasma einer Hemmung der enzymatischen Aktivität durch andere Inhibitoren unterliegt. Im Falle einer geringen Inhibition durch andere plasmatische Inhibitoren kann man jedoch vermuten, dass die HAPB-vermittelte BK-Freisetzung möglicherweise zu einer Verstärkung des HAE-Pathomechanismus führen kann. Bei akuten HAE-Attacken ist die Plasmakonzentration von BK, dem wesentlichen Mediator in der Pathogenese von HAE, bis zum zwölffachen des oberen Normalwertes (5-10 fmol/mL) erhöht (NUSSBERGER *et al.*, 1998; CUGNO *et al.*, 2003). Durch die Aktivität von HAPB könnte ein zusätzlicher Anstieg der Konzentration von BK im Plasma verursacht werden. Experimentelle Studien zur BK-Konzentration im Plasma von HAE-Patienten in Korrelation zur messbaren enzymatischen Aktivität von HAPB könnten hier Aufschluss darüber geben, ob HAPB eine Verstärkung des HAE-Pathomechanismus hervorrufen kann.

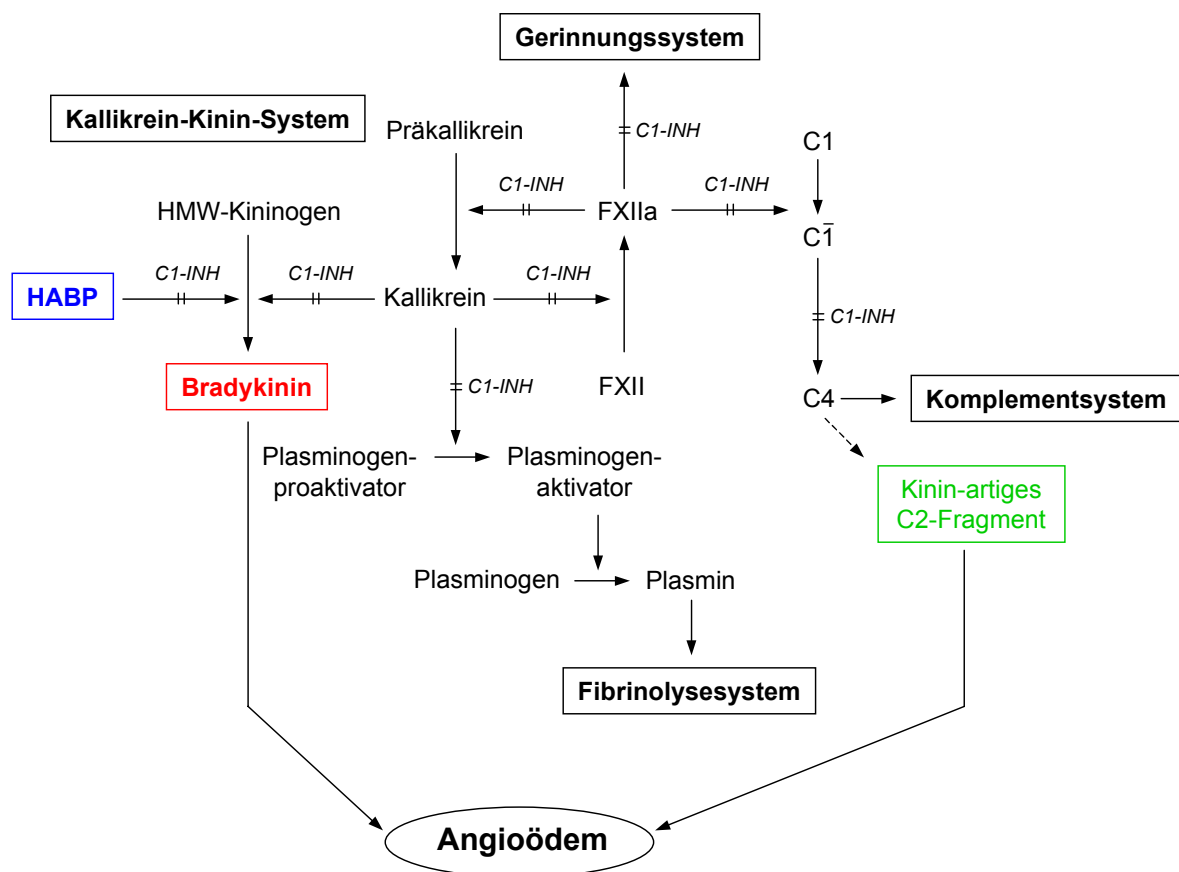


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des HAE-Pathomechanismus und die Rolle von HAPB. Der C1-Inhibitor (C1-INH) spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung des Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-Systems. *In vivo* ist der C1-INH der einzige bekannte Inhibitor des Komplementsystems und der bedeutendste Inhibitor (> 90 %) des FXIIa-abhängigen Kontaktphasensystems. Auch für HAPB stellt der C1-INH einen starken potentiell physiologischen Inhibitor dar. Im Falle einer C1-INH-Defizienz beim Hereditären Angioödem (HAE) kann HAPB durch vermehrte Bradykinin-Bildung möglicherweise zu einer Verstärkung der Symptomatik führen.

Die HABP-vermittelte Aktivierung der ERK1/2-abhängigen Signalkaskade über den FGFR1 in HUVECs beruht auf der Hypothese, dass HABP durch proteolytische Spaltung in der ECM gespeicherte bFGF-Moleküle freisetzt, welche den FGFR1 aktivieren. bFGF ist ein starker Angiogenesefaktor, dessen biologische Funktion vor allem in der Induktion der Zellproliferation und -differenzierung von Gefäßendothelien und der damit verbundenen positiven Regulation der Angiogenese liegt (FOLKMAN & SHING, 1992). Die Angiogenese spielt eine entscheidende Rolle bei der Geweberegeneration im Verlauf von Wundheilungs- und Entzündungsprozessen. Zudem ist sie die wesentliche Voraussetzung für die Tumorprogression. Der Ablauf der Angiogenese, von einem Tumor induziert, kann im allgemeinen in drei Stadien unterteilt werden: 1. Initiale Stimulation, 2. Proliferation und Invasion, 3. Reifung. Zuerst synthetisieren und sekretieren die Tumor- und Entzündungszellen Zytokine und Wachstumsfaktoren, die auf die Gefäße zielen. Sowohl bFGF als auch der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) werden von vielen Tumoren sezerniert und haben angiogene Eigenschaften. Diese Faktoren stimulieren die Proliferation der Gefäßzellen und ihr invasives Wachstum. Dadurch entstehen Blutgefäße, die in den Tumor eindringen und ihn ernähren. Die neu entstandenen Gefäße erleichtern die Tumoringression, weil die an der Gefäßspitze lokalisierten Endothelzellen verschiedene Enzyme wie die Matrix-Metalloprotease 2 (MMP-2), MMP-9 und uPA freisetzen, die durch Proteolyse das Matrixgewebe abbauen und so die Ausbreitung der Tumorzellen in die Matrix und darüber hinaus ermöglichen. Das neugebildete Gefäßsystem sichert dem Tumor die nötige Versorgung, bietet den Tumorzellen aber auch die Strombahn, auf der sie den Primärtumor verlassen und in andere Regionen metastasieren können (ELICEIRI & CHERESH, 2000; DAMMACCO *et al.*, 2000).

FGF übt seine angiogene Wirkung auf humane Endothelzellen in erster Linie über die Aktivierung des spezifischen Wachstumsfaktorrezeptors und die anschließende Induktion von intrazellulären Signalkaskaden (z. B. ERK1/2-Kaskade) aus, die die Genexpression regulieren und Einfluß auf die Zellproliferation haben. Da HABP in HUVECs den FGF-abhängigen ERK1/2-Signalweg über den FGFR1 aktiviert, liegt zunächst die Vermutung nahe, dass die Protease eventuell das Zellwachstum aktivieren und zu einer Verstärkung der angiogenen Wirkung von FGF führen kann. Wie bereits erwähnt, beweisen parallel zu dieser Arbeit in der eigenen Arbeitsgruppe erzielte Resultate jedoch im Gegensatz dazu die Inhibition der bFGF-vermittelte Proliferation von HUVECs. HABP inaktiviert bFGF-Moleküle durch proteolytische Degradation und neutralisiert auf diese Weise deren

proangiogene Wirkung. Da HABP zudem auch einen negativen Einfluß auf die Adhäsion und Migration von HUVECs ausübt, kann hier über eine mögliche (patho-)physiologische Bedeutung von HABP in Bezug auf die (Tumor-)Angiogenese spekuliert werden. Durch die Inaktivierung von bFGF, welches von Tumorzellen während der Tumorgenese freigesetzt wird, kann HABP möglicherweise das Tumorwachstum kontrollieren und somit ein potentiell Krebstherapeutikum darstellen.

4 Zusammenfassung

Die Hyaluronsäure-bindende Protease (HABP) ist eine 65-70 kDa große Serinprotease aus humanem Plasma, die sowohl den Gerinnungsfaktor VII als auch die Plasminogen-Aktivatoren Pro-Urokinase (pro-uPA) und den Gewebsplasminogen-Aktivator (tPA) enzymatisch spalten und aktivieren kann. Des Weiteren ist HABP in der Lage, durch Proteolyse HMW-Kininogen (HK) zu aktivieren und dabei das vasoaktive Peptidhormon Bradykinin (BK) freizusetzen. Die Plasmaprotease weist somit sowohl prokoagulatorische als auch profibrinolytische Eigenschaften auf. HABP besitzt zudem eine hohe Affinität zu Hyaluronsäure und Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen und interagiert mit Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). Dieses und die Tatsache, dass die essentiellen Prozesse der Gerinnung und Fibrinolyse in Komplexen an der Zellmembran von Thrombozyten und Endothelzellen ablaufen, deuten auf eine Zelloberflächen-gerichtete Funktion des Enzyms hin.

Basierend auf ersten Untersuchungen zur Aktivierung von vaskulären Zellen durch HABP konnten neben den hämostatischen Funktionen auch zelluläre Funktionen der Plasmaprotease postuliert werden. In fluorimetrischen Studien wurden die Aktivierung humaner Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs) durch HABP und eine dadurch ausgelöste Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nachgewiesen. Die Überprüfung der bereits bekannten Proteaserezeptoren für Thrombin (PAR-1/3/4), Trypsin (PAR-2) oder den Gerinnungsfaktor Xa (EPR-1) ergab, dass keiner dieser Rezeptoren das beobachtete Signal vermittelt. Interessanterweise wird die Ca^{2+} -Mobilisierung über BK induziert, das durch die proteolytische Spaltung von Zelloberflächen-assoziiertem und exogenem HK durch HABP freigesetzt wird. Als sekundäres Signal aktiviert BK seinen endothelialen Rezeptor B2 (B2R), der den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermittelt. Den Beweis dafür erbrachten Experimente in Gegenwart des B2R-Antagonisten HOE140, durch den das Ca^{2+} -Signal vollständig unterdrückt wird.

Zur Aufklärung weiterer HABP-induzierter Signaltransduktionswege wurde die Aktivierung verschiedener Proteinkinasekaskaden mittels Western Blot-Analyse untersucht. HABP induziert in HUVECs eine zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung (Phosphorylierung) der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1/2. Ebenso wurde eine durch HABP stimulierte Phosphorylierung der Proteinkinasen Raf und MEK1/2, die ERK1/2 in der Signalkaskade vorgeschaltet sind, nachgewiesen. Die Hemmung des B2R mit HOE140 resultierte trotzdem in einer Aktivierung von ERK1/2. ERK1/2 wird somit nicht über den B2R, sondern über einen anderen Rezeptor aktiviert.

Der ERK1/2-abhängige MAPK-Signalweg ist ein typischer Wachstumsfaktor-induzierter Weg. Daher wurde überprüft, ob der endotheliale Rezeptor für den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) FGFR1 in die HABP-induzierte Aktivierung von ERK1/2 involviert ist. In Studien in Gegenwart des spezifischen FGFR1-Inhibitors SU5402 wurde die Aktivierung von ERK1/2 vollständig inhibiert. Dieses beweist, dass der FGFR1 die HABP-induzierte Aktivierung von ERK1/2 vermittelt. Der Einsatz von FGF-neutralisierenden Antikörpern führte zu einer Unterdrückung der FGFR1-vermittelten Aktivierung von ERK1/2. Damit ist FGF als sekundäres Signal, ähnlich wie im Falle von BK und des B2R, der Schlüsselauslöser für die beobachtete Phosphorylierung von ERK1/2. Eine Hypothese für den dafür verantwortlichen Aktivierungsmechanismus ist, dass HABP durch proteolytische Spaltung in der ECM gespeicherte FGF-Moleküle freisetzt, die über den FGFR1 die ERK1/2-Kaskade aktivieren. Ein solcher Mechanismus wurde bereits auch für die Proteasen Plasmin, Thrombin, Heparanase und Collagenase publiziert. HABP könnte auf diese Weise Einfluß auf die Proliferation und das Wachstum von Endothelzellen nehmen, was im Hinblick auf die Angiogenese von Bedeutung sein kann. Zurzeit ist dies jedoch noch spekulativ und muß in weiterführenden Experimenten bewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate veranschaulichen, dass HABP in HUVECs über sekundäre Signale zwei voneinander unabhängige Signalwege induziert, über welche die Plasmaprotease auch Einfluß auf die Genexpression der Zellen nehmen kann. Dieses wurde durch die Identifizierung der HABP-induzierten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB und c-Myc sowie der Translationsfaktoren eIF-4E und p70S6K bewiesen. Die Aktivierung von CREB und c-Myc verläuft dabei über zwei getrennte Signalwege. CREB wird B2R-abhängig und c-Myc FGFR1-abhängig aktiviert.

Des Weiteren zeigten Immunfluoreszenzexperimente, dass HABP von HUVECs über Endocytose internalisiert wird und in Lysosomen im Cytoplasma der Zellen lokalisiert ist. Der Nachweis auf endocytotische HABP-abhängige Organellen wurde mit Hilfe eines spezifischen Fluoreszenz-markierten Lysosomenindikators geführt. Damit unterliegt HABP vermutlich einem für Endothelzellen und Hepatozyten typischen auf rezeptor-vermittelter Endocytose basierenden Regulationsmechanismus zur Entfernung von Proteasen aus dem zirkulierenden Blutplasma, der so genannten *clearance*.

Durch die Aufklärung der beschriebenen unterschiedlichen intrazellulären Signalwege, die durch HABP über die Freisetzung von Mediatoren aktiviert werden, konnten erstmalig auch zelluläre Funktionen der Plasmaprotease demonstriert werden.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprachen dem Reinigungsgrad *pro analysis*.

5.1.2 Proteine, Enzyme und Inhibitoren

Tabelle 5.1: Proteine, Enzyme und Inhibitoren

Bezeichnung	Firma / Firmensitz
Aprotinin	Roche, Mannheim
BSA	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Choleratoxin	Calbiochem, Bad Soden
HOE140	Sigma, Deisenhofen
Pertussistoxin	Calbiochem, Bad Soden
PPACK	Calbiochem, Bad Soden
SU5402	Calbiochem, Bad Soden
U0126	Cell Signaling (NEB), Frankfurt

5.1.3 Standards und Kits

Tabelle 5.2: Standards und Kits

Bezeichnung	Firma / Firmensitz
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
ECL	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Prestained SDS-PAGE Standard	New England Biolabs, Frankfurt

5.1.4 Säulenmaterialien

Tabelle 5.3: Säulenmaterialien

Bezeichnung	Firma / Firmensitz
Aprotinin-Eupergit	Sigma, Deisenhofen
Q Sepharose FF	Amersham-Pharmacia, Freiburg

5.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma / Firmensitz
Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Mikrotiterplatten (96 wells)	Nunc, Wiesbaden
Spritzen-Sterilfilter (0,2 u. 0,45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Sterilfilter (0,2 u. 0,45 µm)	Nalgene-Nunc Int., Rochester, USA
Transfermembran Immobilon-P (PVDF)	Millipore, Eschborn
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

5.1.6 Geräte

Tabelle 5.5: Geräte

Bezeichnung	Firma / Firmensitz
Blot-Tank (Mighty Small Transphor Unit TE 22)	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Digitalkamera Axioacam	Zeiss, Oberkochen
Elektrophoresekammer (Mighty Small II SE260)	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40 FL	Zeiss, Oberkochen
Fluoroskan Ascent FL Fluorometer	Labsystems, Helsinki, Finnland
FPLC-System	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Gradientenmischer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Laborzentrifuge Variofuge 3.0R	Kendro/Heraeus, Hanau
Lumineszenzspektrometer LS-50 B	Perkin Elmer, Rodgau
Mikrotiterplatten-Photometer	SLT, Crailsheim
Peristaltikpumpe P1	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Photometer Ultrospec 3000	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Sorvall RC 28S-Zentrifuge	Du Pont, Wilmington, USA
Tischkühlzentrifuge Biofuge fresco	Kendro/Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin
Umwälz-Thermostat	Haake, Karlsruhe
Vakuum-Konzentrator	Eppendorf, Hamburg

5.1.7 Antikörper

Tabelle 5.6: Primärantikörper

Bezeichnung	Quelle	mono-/polyklonal	Firma / Firmensitz
α -smooth muscle actin-Antikörper	Maus	monoklonal	Sigma, Deisenhofen
aFGF-Antikörper, neutralisierend	Maus	monoklonal	Sigma, Deisenhofen
bFGF-Antikörper, neutralisierend	Maus	monoklonal	Sigma, Deisenhofen
FGF-Rezeptor 1-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
HABP-Antikörper	Huhn	polyklonal	Paul-Ehrlich-Institut, Langen
HABP-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Biotrend, Köln
HABP-Antikörper (mAb1102; gegen schwere Kette von HABP)	Maus	monoklonal	Aventis Behring, Marburg
HABP-Antikörper (mAb677; gegen leichte Kette von HABP)	Maus	monoklonal	Aventis Behring, Marburg
p44/42 MAPK-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-c-Myc-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-CREB-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-eIF-4E-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-Elk-1-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-FGFR1-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-MEK1/2-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-MSK1/2-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-p38 MAPK-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-p44/42 MAPK-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-p70S6K-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-p90RSK-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-Raf-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Phospho-SAPK/JNK-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
von Willebrand-Faktor-Antikörper	Kaninchen	polyklonal	DAKO Diagnostika, Hamburg

Tabelle 5.7: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Markierung	Firma / Firmensitz
Anti-Huhn-IgG	Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG	Ziege	Horseradish peroxidase (HRP)	Cell Signaling (NEB), Frankfurt
Anti-Maus-IgG	Kaninchen	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma, Deisenhofen

5.1.8 Zellkulturmaterialien

Tabelle 5.8: Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Firma / Firmensitz
BSA (cell culture grade)	Sigma, Deisenhofen
Dispase II, 10x (24 U/mL)	Roche, Mannheim
DMSO (cell culture grade)	Sigma, Deisenhofen
Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin	Promocell, Heidelberg
FBS	Invitrogen/GibcoBRL, Karlsruhe
Fibronectin	Becton Dickinson, Heidelberg
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Applichem, Darmstadt
Knopfkanülen	Acufirm, Dreieich
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Labcooler	Nalgene-Nunc Int., Rochester, USA
L-Glutamin	Invitrogen/GibcoBRL, Karlsruhe
M199 (+ Earle's Salt)	Invitrogen/GibcoBRL, Karlsruhe
MCDB131	Invitrogen/GibcoBRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/GibcoBRL, Karlsruhe
rhbFGF	Promocell, Heidelberg,
rhEGF	Promocell, Heidelberg
TNS	CellSystems, St. Katharinen
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	CellSystems, St. Katharinen
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiwellplatten	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden

5.1.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 5.9: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x SDS-PAGE-Laufpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3
1x SDS-Probenpuffer:	62,5 mM Tris 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 50 mM DTT 0,01 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,8
1x Towbin-Transfer-Puffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
2x Chromogenpuffer:	50 mM Tris 150 mM NaCl 12,5 mM CaCl ₂ 0,1 % (v/v) Tween-20 pH 8,2
4x Runningbuffer für SDS-PAGE:	1,5 M Tris pH 8,8
Lösung A für SDS-PAGE:	30 % (v/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Lösung C für SDS-PAGE:	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
PBS-Dulbecco:	4 mM KH ₂ PO ₄ 16 mM Na ₂ HPO ₄ 115 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂

PBS-Tween:	4 mM KH_2PO_4 16 mM Na_2HPO_4 115 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween-20
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):	4 mM KH_2PO_4 16 mM Na_2HPO_4 115 mM NaCl
Puffer A für Chromatographie:	50 mM Na_2HPO_4 50 mM NaH_2PO_4 10 mM Benzamidin pH 6,0
Puffer B für Chromatographie:	50 mM Na_2HPO_4 50 mM NaH_2PO_4 10 mM Benzamidin 200 mM NaCl pH 6,0
Puffer C für Chromatographie:	50 mM Na_2HPO_4 50 mM NaH_2PO_4 10 mM Benzamidin 500 mM NaCl pH 6,0
Puffer D für Chromatographie:	50 mM Na_2HPO_4 50 mM NaH_2PO_4 10 mM Benzamidin 2 M NaCl pH 6,0
Puffer E1 für Chromatographie:	20 mM MES pH 6,0
Puffer E2 für Chromatographie:	50 mM Natriumacetat 50 mM Benzamidin 200 mM NaCl pH 3,0
Puffer I für Chromatographie:	50 mM Natriumacetat pH 5,5
Puffer II für Chromatographie:	50 mM Natriumacetat 300 mM NaCl pH 5,5

Puffer III für Chromatographie:	50 mM Natriumacetat 2 M NaCl pH 5,5
Puffer W1 für Chromatographie:	50 mM Tris pH 8,0
Puffer W2 für Chromatographie:	50 mM Tris 500 mM NaCl pH 8,0

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit sterilem H₂O_{bidest} angesetzt.

Alle für die Chromatographie verwendeten Puffer wurden vor ihrer Verwendung durch ein Filter (0,45 µm) sterilfiltriert.

5.1.10 Zellkulturmedien und -lösungen

Tabelle 5.10: Zellkulturmedien und -lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
HEPES-modified Tyrode's solution (HMTS):	132 mM NaCl 4 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 9,5 mM HEPES 5 mM D-Glucose 0,3 % (w/v) BSA pH 7,4
Kryokonservierungs-Medium:	70 % (v/v) Kulturmedium 20 % (v/v) FBS, hitzeinaktiviert 10 % (v/v) DMSO
M199-BSA:	M199 0,1 % (w/v) BSA 50 µg/mL Streptomycin 50 U/mL Penicillin
M199-FBS (Kulturmedium Passage 0):	M199 20 % (v/v) FBS, hitzeinaktiviert 50 µg/mL Streptomycin 50 U/mL Penicillin

MCDB131 (Kulturmedium ab Passage 1):	MCDB131 10 mM L-Glutamin 8 % (v/v) FBS, hitzeinaktiviert 0,1 ng/mL rhEGF 1 ng/mL rhbFGF 0,4 % (v/v) ECGS/H 50 µg/mL Streptomycin 50 U/mL Penicillin
MCDB131-serumfrei:	MCDB131 10 mM L-Glutamin 0,5 % (w/v) BSA 50 µg/mL Streptomycin 50 U/mL Penicillin

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkulturtechniken

5.2.1.1 Isolierung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

Die Isolierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) erfolgte in modifizierter Form nach der von JAFFE *et al.* beschriebenen Methode (JAFFE *et al.*, 1973). Die von der Asklepios-Klinik (Langen) zur Verfügung gestellten humanen Nabelschnüre wurden direkt nach der Geburt in sterilen Gefäßen bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 h verarbeitet. Die Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur (RT). Zu Beginn wurden die Nabelschnüre mit sterilen Mullkompressen von Blutresten gesäubert und auf Beschädigungen überprüft. Aus Sterilitätsgründen wurde mit einem Skalpell von jedem Ende der Nabelschnur ein kleines Stück abgetrennt. Die Vene wurde mit einer Knopfkanüle kanüliert und mit 20-40 ml steriler und auf 37°C erwärmter *Hanks' balanced salt solution* (HBSS) gespült, um restliche Blutzellen und Thromben aus dem Gefäß zu entfernen. Nach der Reinigung des Venenlumens wurden je nach Länge der Nabelschnur 10-15 mL 37°C-warmer Dispase II (2,4 U/mL) in die Vene eingefüllt und das untere Nabelschnurende mit einer Arterienklemme abgeklemmt. Anschließend wurde die Nabelschnur in sterile Alufolie verpackt und 30-45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Dispase-Lösung mit M199-BSA (M199, 0,1 % BSA, 50 µg/mL Streptomycin, 50 U/mL Penicillin) herausgespült, die Vene erneut mit Medium gefüllt und die Nabelschnur leicht massiert, um die Endothelzellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden mit ca. 50 mL M199-BSA herausgespült, in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 100 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 12 mL Kulturmedium M199-FBS (M199, 20 % (v/v) FBS, 50 µg/mL Streptomycin, 50 U/mL Penicillin) resuspendiert und die Zellsuspension auf eine für 30 min mit 1 µg/cm² Fibronectin beschichtete 85 mm-Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium dieser 0. Passage gegen frisches Medium ausgetauscht, um noch vorhandene Erythrozyten und abgestorbene Zellen zu entfernen.

Zur Verifizierung der Endothelzellen wurde in einer späteren Passage eine immuncytochemische von Willebrand-Faktor-Färbung vorgenommen.

5.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von HUVECs

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 %. Ein Mediumwechsel wurde im Abstand von 2-3 Tagen vorgenommen. Der konfluente Monolayer zeigte im Phasenkontrastauflicht-Mikroskop das für Endothelzellen typische Erscheinungsbild polygonaler, pflastersteinartiger Zellen. Nach erreichter Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 4 mL HBSS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 1,5 mL Trypsin/EDTA trypsinisiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens TNS (*Trypsin neutralisation solution*) wurde die Trypsinreaktion abgestoppt, die Zellen in ein 50 mL-Röhrchen überführt und zentrifugiert (150 x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 oder 1:3 auf neue, mit Fibronectin (1 µg/cm²) beschichtete Kulturgefäße ausgesät. Die Kultivierung der HUVECs ab Passage 1 erfolgte in MCDB131 mit 8 % (v/v) FBS, 10 mM L-Glutamin, 0,1 ng/mL rekombinantem humanem epidermalem Wachstumsfaktor (rhEGF), 1 ng/mL rekombinantem humanem basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (rhbFGF), 0,4 % Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin (ECGS/H), 50 µg/mL Streptomycin und 50 U/mL Penicillin.

5.2.1.3 Kryokonservierung

Zur Konservierung wurden die Endothelzellen in flüssigem Stickstoff gelagert. HUVECs wurden bis zur Konfluenz in 80 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert, mit HBSS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation (150 x g, 5 min) wurden die Zellen mit 4°C kaltem Kulturmedium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem Kryokonservierungs-Medium (70 % Kulturmedium, 20 % FBS, 10 % DMSO) resuspendiert, die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert und mit einem Einfriergerät („Labcooler“) langsam (1°C/min) auf -80°C eingefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.2.1.4 Auftauen von Zellen

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, in ein 50 mL-Röhrchen überführt und das DMSO durch tropfenweise Zugabe von 10 mL warmem Kulturmedium herausverdünnt. Nach Zentrifugation (150 x g, 5 min) wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und in eine Fibronectin-beschichtete (1 µg/cm²) 80 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

5.2.1.5 Trypanblau-Ausschlußfärbung

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch Versetzen von 50 µl Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (0,4 %) und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Als tote Zellen werden blau gefärbte Zellen definiert, da lebende Zellen wegen ihrer intakten Membran den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen.

5.2.2 Zellbiologische Methoden

5.2.2.1 Mycoplasmen-Test (DAPI-Färbung)

Mycoplasmen sind die kleinsten bekannten Prokaryoten. Sie besitzen keine Zellwände und parasitieren häufig auf der Plasmamembran humaner und tierischer Zellen. Dabei können sie dem Kulturmedium Arginin entziehen. Kontaminationen mit Mycoplasmen stellen eine stetige Gefahr in der Zellkultur dar, weil sie wegen ihrer Flexibilität und geringen Größe von 100-250 nm Sterilfilter mit einer nominellen Porengröße von 0,2 µm passieren können. Eine Mycoplasmen-Kontamination macht sich häufig durch hohen Arginin-Verbrauch und schlechtes Zellwachstum bemerkbar. Am schnellsten lassen sie sich durch Anfärben ihrer DNA mit dem DNA-bindenden Fluorochrom DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) sichtbar machen (KUBIST *et al.*, 1987). Die in dieser Arbeit verwendeten Endothelzellen wurden in regelmäßigen Abständen mit der DAPI-Färbung auf Mycoplasmen fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Hierzu wurden die Endothelzellen auf Fibronectin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Objektträgern ausgesät, nach erreichter Konfluenz mit 2 % Paraformaldehyd (in PBS-Dulbecco) fixiert und anschließend mit 0,5 % TX-100 (in PBS-Dulbecco) permeabilisiert. Für die DNA-Färbung wurde eine 100 µM DAPI-Stocklösung (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) auf 300 nM in PBS verdünnt, die Zellen mit dieser Lösung bedeckt und für 1-5 min bei RT inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckt (siehe Kap. 5.2.2.6) und in einem mit den entsprechenden Filtern ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Excitationsmaximum des an Doppelstrang-DNA gebundenen DAPI-Farbstoffs liegt bei 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

5.2.2.2 Verifizierung von Endothelzellen mittels von Willebrand-Faktor -Nachweis

Um zu gewährleisten, dass es sich bei den aus der humanen Nabelschnurvene isolierten Zellen um Endothelzellen handelt, wurden die Zellen einer Immunfärbung mit dem Endothelzell-spezifischen Marker von Willebrand-Faktor (vWF) unterzogen. Endothelzellen synthetisieren und sekretieren konstitutiv große Mengen an funktionell aktiven vWF-Molekülen (JAFKE & NACHMAN, 1975), deren Nachweis der Verifizierung einer reinen HUVEC-Kultur dient.

Hierzu wurden HUVECs auf Objektträgern kultiviert, bei 70-100 % Konfluenz dreimal mit warmem PBS-Dulbecco gespült und zur Fixierung 1 h bei RT mit frisch angesetzter 2 % Paraformaldehyd-Lösung (in PBS-Dulbecco) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit PBS-Dulbecco gewaschen und zur Membran-permeabilisierung 15 min mit 0,5 % Triton X-100 in PBS-Dulbecco inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten wurden unspezifische Bindungsstellen 15 min bei RT mit 10 % Roti-Immunoblock (Roth, Karlsruhe) blockiert. Der Monolayer wurde erneut gewaschen und der Primärantikörper Anti-human-von Willebrand-Faktor aus Kaninchen in 1 % Roti-Immunoblock für 1 h bei 37°C zugegeben. Nach dem Absaugen der Antikörperlösung wurden die Zellen fünfmal gewaschen und für 30 min bei RT mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) aus Ziege in 1 % Roti-Immunoblock inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Excitationsmaximum von FITC liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 520 nm.

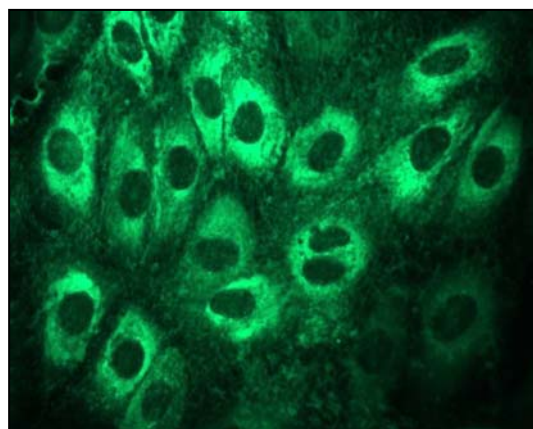


Abbildung 5.1: Immunologischer Nachweis von von Willebrand-Faktor zur Verifizierung einer reinen HUVEC-Kultur. vWF ist ein typischer Endothelzell-Marker, der in humanen Endothelzellen konstitutiv exprimiert und sezerniert wird. Die hier dargestellte Abbildung beweist die Reinheit der getesteten Kultur.

5.2.2.3 Identifizierung von Endothelzellen mittels Dil-markiertem acetyliertem LDL

Neben dem Nachweis von vWF kann die Identifizierung von Endothelzellen auch durch die Aufnahme von acetyliertem *low density lipoprotein* (LDL) erfolgen (VOYTA *et al.*, 1984a; VOYTA *et al.*, 1984b). Hierzu wird acetyliertes LDL verwendet, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat) markiert ist. Das Lipoprotein wird von den Endothelzellen endocytotisch aufgenommen, durch lysosomale Enzyme degradiert und der Fluoreszenzfarbstoff in der intrazellulären Membran angehäuft. Zum Nachweis von Dil-markiertem acetyliertem LDL wurden HUVECs auf Objektträgern herangezüchtet und für 4 h mit 10 µg/mL Dil-Ac-LDL (CellSystems, St. Katharinen) in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Dil-freiem Kulturmedium gewaschen und mit 3 % Formaldehyd (in PBS-Dulbecco) für 20 min bei RT fixiert. Nach dem Eindecken mit Mowiol (siehe Kap. 5.2.2.6) wurden die Präparate in einem Fluoreszenzmikroskop mit den passenden Filtern ausgewertet. Das Absorptionsmaximum für Dil-Ac-LDL liegt bei 555 nm, das Emissionsmaximum bei 571 nm.

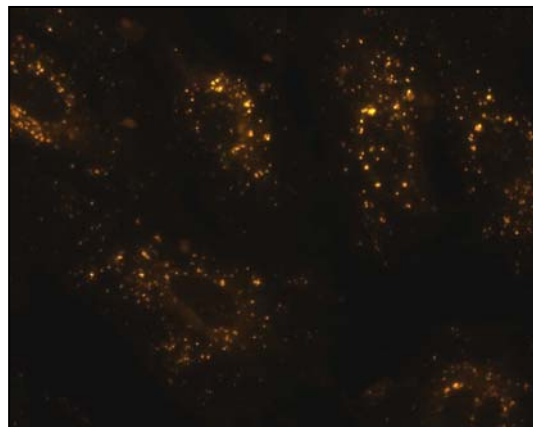


Abbildung 5.2: Nachweis von Dil-markiertem acetyliertem LDL in HUVECs. Die Reinheit der hier getesteten HUVEC-Primärkultur wird durch den Nachweis von endocytisiertem Dil-Ac-LDL belegt.

5.2.2.4 Immunologischer Nachweis von HABP mittels Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von HABP auf der Zelloberfläche bzw. im Intrazellularraum von HUVECs wurden die Zellen der 1. bis 3. Passage auf Fibronectin-beschichteten (1 µg/cm²) Objektträgern ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen einmal mit warmer *HEPES-modified Tyrode's solution* (HMTS) gewaschen und mit 250 nM HABP (in HMTS) für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-3 mal mit HMTS gewaschen und zur Fixierung 1 h bei

RT mit zuvor frisch angesetztem 2 % Paraformaldehyd (in PBS-Dulbecco) inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten mit PBS-Dulbecco wurde eine 15-minütige Membranpermeabilisierung mit 0,5 % Triton X-100 in PBS-Dulbecco durchgeführt. Eine Permeabilisierung der Zellmembran war nur zum Nachweis von intrazellulären Antigenen notwendig, um die Membran für die verwendeten Antikörper durchgängig zu machen. Beim Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche wurde die Zellmembran nicht permeabilisiert. Nach weiteren fünf Waschschritten wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10 % Roti-Immunoblock für 15 min bei RT blockiert. Die Zellen wurden danach erneut gewaschen und der 1. Antikörper (monoklonaler HABP-Antikörper aus Maus) in 1 % Roti-Immunoblock für 1 h bei 37°C zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung abgesaugt, die Zellen fünfmal gewaschen und für 30 min bei RT mit dem FITC-markierten 2. Antikörper (Anti-Maus-FITC aus Kaninchen) in 1 % Roti-Immunoblock inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckt (siehe Kap. 5.2.2.6) und im Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtersätzen ausgewertet (Excitationsmaximum: 494 nm, Emissionsmaximum: 520 nm).

5.2.2.5 Nachweis lysosomaler Vesikel mit LysoTracker

Der intraluminale pH-Wert von Lysosomen liegt in einem Bereich zwischen 4,5 und 5 und ist notwendig für die Aktivität der Enzyme (Hydrolasen), die für den hydrolytischen Abbau von Molekülen in diesen Vesikeln verantwortlich sind. Mittels azidotroper Fluoreszenz-markierter Reagenzien wie LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) können endocytotische Organellen sichtbar gemacht werden.

Zur Koloalisation von HABP und Lysosomen wurden HUVECs auf Fibronectin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Objektträgern ausgesät und über Nacht kultiviert. Die konfluenten Monolayer wurden einmal mit warmer HMTS gewaschen und gleichzeitig mit 75 nM LysoTracker Red DND-99 und 250 nM HABP in HMTS für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die weitere Behandlung der Präparate wurde wie in Kap. 5.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Die anschließende Auswertung im Fluoreszenzmikroskop erfolgte mit den für LysoTracker Red DND-99 (Absorptionsmaximum: 577 nm, Emissionsmaximum: 590 nm) und FITC entsprechenden Filtersätzen.

5.2.2.6 Mowiol-Einbettung von Fluoreszenz-Präparaten

Fluoreszenzfarbstoffe bleichen durch Lichteinwirkung aus, und zwar besonders schnell durch das Anregungslicht der Mikroskopbeleuchtung. Spezielle Einbettungsmittel wie Mowiol verzögern diesen Effekt (LONGIN *et al.*, 1993). Im Anschluß an die Behandlung der Präparate mit den entsprechenden Antikörpern wurden die auf dem Objektträger fixierten Zellen mit einem Tropfen Mowiol-Lösung überschichtet und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Das eingedeckte Präparat wurde danach für 20 min in einem auf 37°C temperierten Trockenschrank getrocknet und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die Mowiol-Lösung wurde wie folgt angesetzt: 6 g Glycerol und 2,4 g Mowiol 40-88 (Calbiochem, Bad Soden) wurden in ein 50 mL-Röhrchen gegeben und durch Rühren gründlich vermischt. Anschließend wurden 6 mL H₂O zugeben und die Mischung 2 h bei RT stehen gelassen. Nach Zugabe von 12 mL 0,2 M Tris (pH 8,5) wurde die Lösung für 10 min im 50°C-Wasserbad erhitzt und währenddessen gelegentlich gerührt. Durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 x g wurde die Mowiol-Lösung von ungelösten Teilchen befreit, der Überstand aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Das verwendete Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Oberkochen) arbeitete nach dem Prinzip der Auflichtmikroskopie, bei der das Anregungslicht mit einem Farbteilerspigel durch das Objektiv geleitet wird. Das Mikroskop Axioskop 40 FL war mit den entsprechenden Filtersätzen für 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), 1,1'Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat (DiI), Fluoresceiniso-thiocyanat (FITC) und LysoTracker Red DND-99 ausgestattet.

Für die Aufnahmen mit der Digitalkamera AxioCam wurden das 40x- und das 63x-Objektiv des Typs Plan-Neofluar verwendet.

5.2.2.8 Präparation von Zelllysaten nach Stimulation

Für die Stimulationsexperimente wurden $1,75 \times 10^5$ Endothelzellen/Loch in Fibronectin-beschichtete ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 12-Loch-Zellkulturplatten in MCDB131-BSA ausgesät. Durch das Aussäen der Zellen in serumfreiem Kulturmedium sollte eine Reduktion der zellulären Stoffwechselaktivitäten und somit eine Minimierung des Phosphorylierungsgrades von Proteinen auf ein Basalniveau erreicht werden. Nach der

Anheftung der Zellen wurde ein Mediumwechsel mit MCDB131-BSA durchgeführt. Die Stimulation der ruhenden Zellen erfolgte nach 24 h Kultivierung durch Zugabe von 125 nM HABP für 10 min bei 37°C. Inhibitoren wurden, wenn nicht anders angegeben, 30 min vor Beginn des Stimulationsexperimentes in das Kulturmedium zugegeben. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch sofortige Zugabe von 100 µL/well 1x SDS-Probenpuffer lysiert. Nach dem Abschaben der Zellen von der Zellkulturplatte mit einem Zellschaber wurde das Zelllysate in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Viskosität des Zelllysates zu reduzieren wurde die Probe zweimal für 15 s im Ultraschallbad mit Ultraschallwellen behandelt, wodurch zelluläre DNA durch Scherkräfte zerstört wird. Anschließend wurde das Zelllysate für 5 min bei 95°C erhitzt, kurz anzentrifugiert und 20-40 µL des Proteingemischs in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

5.2.2.9 Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$)

5.2.2.9.1 Messung im Lumineszenzspektrometer LS-50 B mit Fura 2

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden HUVECs auf Quarzobjektträgern mit den Abmessungen 45 x 12,5 x 1 mm kultiviert, die zuvor mit Fibronectin (1 µg/cm²) beschichtet worden waren. Nachdem die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren, wurden sie einmal mit warmer HMTS gewaschen und für 1 h bei 37°C mit 5 µM Fura 2/AM (Biotrend, Köln) und 0,025 % (v/v) Pluronic F-127 (Biotrend, Köln), einem nicht-ionischen Detergens, in HMTS mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen. Nach der Farbstoffbeladung wurde die Fura 2/AM-Lösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit HMTS gewaschen. Anschließend wurde der Objektträger in eine mit 3 mL HMTS (37°C) gefüllte rührbare Acryl-Küvette eingesetzt.

Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte in einem Lumineszenzspektrometer Modell LS 50 B (Perkin Elmer, Rodgau), dessen Küvettenhalterung über einen Umwälz-Thermostat auf 37°C temperiert wurde. Bei dem hier verwendeten Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura 2/AM handelt es sich um die membrangängige Form, einen Azetoxymethylester. In dieser ungeladenen Form gelangt der Farbstoff durch Diffusion durch die Plasmamembran in das Cytoplasma, wo endogene Esterasen den Azetoxymethylrest abspalten. Der Farbstoff liegt nun als Anion vor. In dieser Form kann er nicht mehr durch die Plasmamembran diffundieren und reichert sich im Cytoplasma an. Fura 2 kann nun Ca^{2+} -Ionen binden, welches den Farbstoff zum fluoreszieren bringt. Das Emissionsmaximum von Fura 2 verschiebt sich in Abhängigkeit von der Calciumbindung zu einer anderen Anregungswellenlänge hin. Sie beträgt im Calcium-freien Zustand 380 nm und verschiebt

sich mit der Bindung von Calcium auf 340 nm. Die Fura 2-beladenen Zellen wurden im Sekundentakt alternierend mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt und die resultierende Emission bei 510 nm aufgezeichnet. Nach dem Start der Messung wurde zunächst eine stabile Grundlinie als Referenz abgewartet. Danach erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Reagenzien. Zum Abschluß jedes einzelnen Experimentes wurden die maximalen und minimalen Quotientenwerte ermittelt. Der Wert für die intrazelluläre Calciumsättigung (R_{\max}) wurde durch Zugabe von 10 μM Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) erhalten. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 mM EGTA (Calbiochem, Bad Soden) sämtliches Calcium komplexiert und damit der R_{\min} -Wert bestimmt.

Zur Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde zunächst entsprechend den Ausführungen von GRYNKIEWICZ *et al.* (1985) das Verhältnis (R) aus der jeweiligen Emission bei 340 nm- und 380 nm-Anregung errechnet. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde anschließend nach der folgenden Formel ermittelt:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{F_{\min 380}}{F_{\max 380}}$$

Die Dissoziationskonstante (K_d) für den intrazellulären Ca^{2+} -Fura 2-Komplex beträgt 224 nM bei 37°C (GRYNKIEWICZ *et al.*, 1985).

K_d = Dissoziationskonstante des Fura 2- Ca^{2+} -Komplexes

R = F_{340} / F_{380}

R_{\max} = F_{340} / F_{380} bei sättigender Ca^{2+} -Konzentration

R_{\min} = F_{340} / F_{380} bei Ca^{2+} -freier Lösung

$F_{\min 380}$ = Fluoreszenzintensität bei 380 nm Anregung von Ca^{2+} -freiem Farbstoff

$F_{\max 380}$ = Fluoreszenzintensität bei 380 nm Anregung von Ca^{2+} -gebundenem Farbstoff

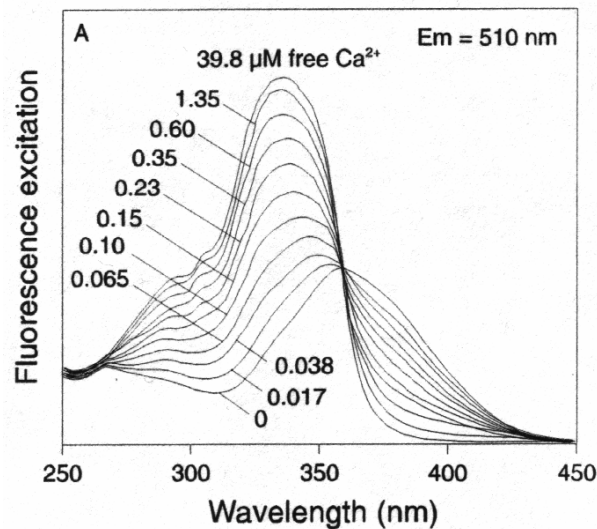


Abbildung 5.3: Anregungsspektrum von Fura 2 in Gegenwart von Konzentrationen an freiem Calcium zwischen 0 und 39,8 μM . Mit zunehmender Konzentration an freiem Calcium kommt es zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums von Fura 2 hin zu kürzeren Wellenlängen. Abkürzungen: Em: Emission.

5.2.2.9.2 Messung im Fluoroskan Ascent FL Fluorometer mit Fluo 3

Zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit dem Mikrotiterplatten-Fluorometer Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finnland) wurden HUVECs in Fibronectin-beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 96 well-Zellkultur-Platten über Nacht herangezüchtet. Nachdem die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren, wurden sie einmal mit warmer HMTS gewaschen und für 1 h bei 37°C mit $5 \mu\text{M}$ Fluo 3/AM (Biotrend, Köln) und 0,025 % (v/v) Pluronic F-127 in HMTS mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen. Nach der Farbstoffbeladung wurde die Fluo 3/AM-Lösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit HMTS gewaschen. Anschließend wurden die zu messenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit $50 \mu\text{L}$ HMTS befüllt und die Messung gestartet (Excitationsfilter: 485 nm , Emissionsfilter: 538 nm). Sobald die Grundlinie der Messung stabil war, wurden $50 \mu\text{L}$ des vorverdünnten, zu testenden Reagenzes mit der Einspritzpumpe des Fluorometers hinzugegeben. Bei einer Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen kommt es zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit der Calciumbeladung des Indikators. Ebenso wie im Falle von Fura 2 wurde der Wert für die intrazelluläre Calciumsättigung (F_{max}) durch Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Ionomycin erhalten. Durch die Zugabe von 10 mM EGTA wurde der F_{min} -Wert bestimmt. Die Dissoziationskonstante (K_d) für den intrazellulären Ca^{2+} -Fluo 3-Komplex beträgt 390 nM bei 37°C . Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

K_d = Dissoziationskonstante des Fluo 3- Ca^{2+} -Komplexes

F = gemessene Fluoreszenzintensität

F_{\max} = Fluoreszenzintensität bei sättigender Ca^{2+} -Konzentration

F_{\min} = Fluoreszenzintensität bei Ca^{2+} -freier Lösung

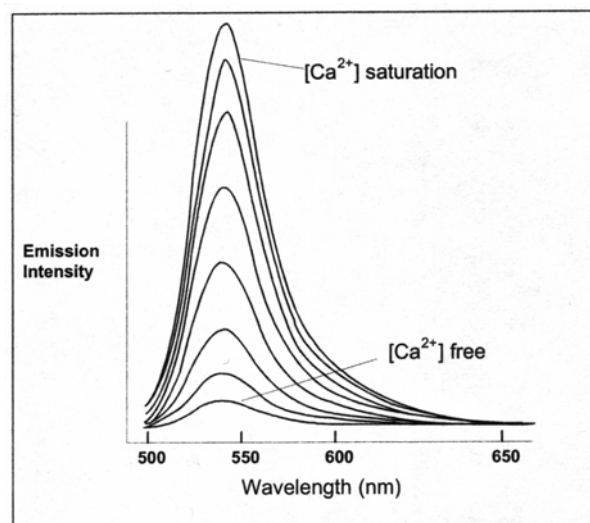


Abbildung 2.4: Emissionsspektrum von Fluo 3 in Gegenwart verschiedener Konzentration an freiem Calcium. Mit zunehmender Konzentration an freiem Calcium kommt es zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit der Calciumbeladung des Indikators. Anregungswellenlänge: 488 nm, Emissionsmaximum: 526 nm.

5.2.2.10 Radioimmunoassay (RIA) zum Nachweis von Bradykinin

Zum Nachweis von BK in Zellkulturüberständen wurden die Zellen einer konfluenten 175 cm²-Zellkulturflasche (ca. $1,49 \times 10^7$ HUVECs) zweimal mit je 10 mL HMTS (+ 50 μM ZnCl_2) gewaschen und für die angegebenen Zeiten mit 500 nM HABP in 4 mL HMTS (+ 10 mM Captopril u. 1 μM HOE 140) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine Pufferkontrolle diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden die 4 mL Zellkulturüberstand im Verhältnis 1:10 einer Ethanol-fällung mit 96 %igem reinem Ethanol unterzogen. Nach einstündiger Inkubation des Fällungsansatzes bei 4°C wurden die Proben für 10 min in einem auf 70°C erhitzten Wasserbad inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Durch Zentrifugation für eine Stunde bei 20.000 rpm und 4°C wurden die gefällten hochmolekularen Proteine sedimentiert und der die niedermolekularen Proteine enthaltende alkoholische Überstand in einem Vakuum-Konzentrator eingedampft. Die Menge des im

einreduzierten Überstand enthaltenen BKs wurde nach der von FINK *et al.* beschriebenen Methode im RIA bestimmt (FINK *et al.*, 1985).

5.2.3 Proteinbiochemische Methoden

5.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) und wurde in einem vertikalen System durchgeführt. Als Trenngele dienten 10 x 8,5 cm große und 1,5 mm dicke Gradientengele mit 5-10 %, 5-20 % oder 7,5-20 % Polyacrylamid, die mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen wurden. Je nach verwendetem Trenngel betrug die Polyacrylamidkonzentration der Sammelgele 3, 4 oder 5 %.

Tabelle 5.11: Zusammensetzung der Gradientengele

Leichte Trenngellösung:

	5 %	7,5 %
H ₂ O	3 mL	2,58 mL
Lösung A	0,88 mL	1,32 mL
4x Runningbuffer	1,32 mL	1,32 mL
10 % SDS	52,6 µL	52,6 µL
10 % APS	17,9 µL	17,9 µL
TEMED	1,8 µL	1,8 µL

Schwere Trenngellösung:

	10 %	20 %
Saccharose	0,84 g	0,84 g
H ₂ O	1,74 mL	0 mL
Lösung A	1,74 mL	3,47 mL
4x Runningbuffer	1,32 mL	1,32 mL
10 % SDS	52,6 µL	52,6 µL
10 % APS	17,9 µL	17,9 µL
TEMED	1,8 µL	1,8 µL

Sammelgellösung:

	3 %	4 %	5 %
H ₂ O	3,23 mL	3,06 mL	2,9 mL
Lösung A	0,5 mL	0,67 mL	0,83 mL
Lösung C	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
10 % APS	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

Die Proteinproben wurden direkt in 1x SDS-Probenpuffer gelöst, 5 min bei 95°C erhitzt und nach einer kurzen Zentrifugation auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts von aufgetrennten Proteinen wurde ein Prestained SDS-PAGE Standard (NEB, Frankfurt) von 6,5 bis 175 kDa eingesetzt. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel für ca. 100 min bis der Bromphenolblau-Marker aus dem Gel herausgelaufen war. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Elektrottransfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran überführt.

5.2.3.2 Western Blot-Analyse

5.2.3.2.1 Elektrottransfer von Proteinen

Proteingemische lassen sich nach einer Auftrennung durch diskontinuierliche SDS-PAGE (Kap. 5.2.3.1) durch Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran überführen. Beim Elektrobplot wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld aus dem Gel heraus in Richtung Anode und binden an der Blotmembran (TOWBIN *et al.*, 1979). Die Übertragung der Proteine erfolgte in einem mit Towbin-Transfer-Puffer befüllten Tank-Transfer-System, welches über einen Umwälz-Thermostat auf 10°C temperiert wurde. Ein Magnetrührer gewährleistete eine gleichmäßige Mischung des Transfer-Puffers im Blot-Tank.

Der Aufbau der Blot-Apparatur wurde wie folgt durchgeführt: Die PVDF-Membran wurde zunächst für 1 min in 100 % Methanol äquilibriert. In einem Transfer-Puffer-Bad wurde dann das Gel zusammen mit der äquilibrierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen zwei Whatman-Papiere und zwei Blotschwämmchen gelegt und mit dem Blot-Halterungsgitter in die Transferrkammer eingesetzt. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 2,5 h durchgeführt.

5.2.3.2.2 Immunodetektion von geblotteten Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen, die auf der PVDF-Membran fixiert waren, wurde diese zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen zunächst 1 h in 10 % Roti-Block-Lösung (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des spezifischen Primärantikörpers in 1 % Roti-Block-Lösung für 1 h. Nach zweimaligem Abspülen mit PBS-Tween wurde die Membran dreimal für 15 min mit PBS-Tween gewaschen und für 1 h mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneuten drei Waschschritten wurden die Antikörper-

gebundenen Proteine mit dem ECL-System (Amersham-Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers detektiert. ECL ist eine lichtemittierende, nicht-radioaktive Methode zur Detektion immobilisierter Antigene, die direkt oder indirekt an HRP-gekoppelte Antikörper gebunden sind. Durch die Peroxidase wird die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen katalysiert. Nach der Oxidation befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand, von dem es unter Licht-Emission wieder in den Grundzustand zurückfällt. Das so erzeugte Licht hat eine Wellenlänge von 428 nm und kann durch Schwärzung eines Röntgenfilms detektiert werden.

5.2.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

5.2.3.3.1 Absorptionsmessung von Proteinlösungen

Die spektralphotometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte durch Absorptionsmessung (PETERSEN, 1983) bei einer Wellenlänge von 280 nm nach folgender Näherungsformel:

1 A₂₈₀-Einheit entspricht 1 mg/mL Protein

für HABP: $C_{\text{HABP}} [\text{mg/mL}] = \text{OD}_{280 \text{ nm}} \times 0,6 [\text{mg/mL}]$

5.2.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde das BCA Protein Assay-Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (SCHOEL *et al.*, 1995). Das Prinzip beruht auf der Reaktion von Proteinen mit Cu²⁺ in alkalischen Medien und der selektiven Detektion von Cu²⁺ mit Bicinchoninsäure (BCA). Das wasserlösliche violette Reaktionsprodukt wird bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mitgeführt.

5.2.3.4 Isolierung von HABP

Zur Isolierung von HABP aus humanem Plasma wurde als Ausgangsmaterial bereits angereicherter Prothrombinkomplex verwendet und die Protease über säulenchromatographische Methoden gereinigt. Es wurde zuerst eine QFF-Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, gefolgt von einer Aprotinin-Affinitätschromatographie und einer weiteren QFF-Anionenaustauschchromatographie. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Chromatographieschritte bei RT durchgeführt. Alle für die Chromatographie

verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch durch ein Membranfilter (0,45 μm) sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Chromatographiefraktionen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (siehe Kap. 5.2.3.3.1) bestimmt. Die Detektion von HABP in den Fraktionen erfolgte über den in Kap. 5.2.3.4.4 beschriebenen Aktivitätstest mit chromogenem Substrat.

5.2.3.4.1 Anionenaustauschchromatographie mit Q Sepharose FF

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine Q Sepharose FF-Säule mit einem Bettvolumen von 500 mL eingesetzt, die mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min betrieben wurde. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer B erfolgte der Probenauflauf, wobei angereicherter Prothrombin-komplex, welcher zuvor im Verhältnis 1:1 mit Puffer A verdünnt wurde, mit einer Geschwindigkeit von 5 mL/min auf die Säule aufgetragen wurde. Anschließend wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer C gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 8 mL/min mit einem linearen Gradienten von 0,5 bis 2 M NaCl durch Mischen von Puffer C und D. Das Eluat wurde in 11,25 mL-Fraktionen gesammelt und in einem Aktivitätstest mit einem chromogenen Substrat auf den Gehalt an HABP untersucht (siehe Kap. 5.2.3.4.4). Die Fraktionen maximaler enzymatischer Aktivität wurden vereinigt und für die nachfolgende Chromatographie an Aprotinin-Eupergit aufbewahrt. Die Durchführung der Anionenaustauschchromatographie erfolgte bei 4°C.

Das Säulenmaterial wurde mit 10 mM HCl regeneriert und in PBS mit 0,02 % Natriumazid bei 4°C gelagert.

5.2.3.4.2 Affinitätschromatographie mit Aprotinin-Eupergit

Der nächste Reinigungsschritt erfolgte mit einer Aprotinin-Eupergit-Matrix von 30 mL Volumen. Die Bindung der im Eluat der Anionenaustauschchromatographie vorhandenen Proteine an die Matrix wurde im Batch-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde das Eluat zunächst zur pH-Neutralisierung mit Puffer W1 im Verhältnis 1:2 verdünnt und anschließend zusammen mit der Aprotinin-Eupergit-Matrix, die zuvor mit dem 5-fachen Matrixvolumen Puffer W2 äquilibriert worden war, für 5 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Menge der an die Matrix gebundenen HABP-Moleküle wurde anhand eines chromogenen Aktivitätstests im Überstand überprüft (siehe Kap. 5.2.3.4.4). Nach dem Einfüllen der Matrix in eine Chromatographie-Säule wurde das

Säulenmaterial zunächst mit dem 10-fachen Matrixvolumen 4°C kaltem Puffer W2 und anschließend mit dem 10-fachen Säulenvolumen 4°C kaltem Puffer E1 gewaschen. Die Fließgeschwindigkeit betrug hier 4 mL/min. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über eine Stufenelution mit 200 mM NaCl und einem pH-Wert von 3,0 in Puffer E2 mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min. Nach Erreichen eines pH \leq 5,0 wurde das Eluat in Fraktionen von etwa 20 mL gesammelt. Der pH-Wert der einzelnen Fraktionen wurde mit 2 M Tris auf pH 6,0 eingestellt. Die Fraktionen mit maximaler enzymatischer Aktivität wurden vereinigt und für die nachfolgende Konzentrierung am Anionenaustauscher aufbewahrt.

Die Aprotinin-Eupergit-Matrix wurde mit 10 mM HCl regeneriert und in PBS mit 0,02 % Natriumazid bei 4°C gelagert.

5.2.3.4.3 Konzentrieren mit Anionenaustauscher Q Sepharose FF

Zum Konzentrieren der Proteinlösung nach der Aprotinin-Eupergit-Affinitätschromatographie wurde eine Q Sepharose FF-Matrix mit einem Volumen von 150 mL eingesetzt. Die Bindung der im Eluat der Affinitätschromatographie vorhandenen Proteine an die Matrix wurde im Batch-Verfahren durchgeführt. Nach dem Äquilibrieren der Matrix mit dem 5-fachen Matrixvolumen Puffer I wurde das Eluat der Affinitätschromatographie mit der Matrix vereint und für 2 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Menge der an die Matrix gebundenen HABP-Moleküle wurde anhand eines chromogenen Aktivitätstests im Überstand überprüft (siehe Kap. 5.2.3.4.4). Anschließend wurde das Säulenmaterial in eine Chromatographiesäule gefüllt und mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer II bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 mL/min gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über eine Stufenelution mit 2 M NaCl in Puffer III mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 mL/min. Das Eluat wurde in 1 mL-Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen mit der höchsten enzymatischen Aktivität wurden zusammengefaßt und die Proteinkonzentration der Proteinlösung spektralphotometrisch durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die längerfristige Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte bei -80°C.

Das Säulenmaterial wurde mit 10 mM HCl regeneriert und in PBS mit 0,02 % Natriumazid bei 4°C gelagert.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Plasmaprotease HABP wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Der immunologische

Nachweis von HABP erfolgte mit polyklonalen HABP-Antikörpern aus Kaninchen oder Huhn und einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper.

5.2.3.4.4 Messung der enzymatischen Aktivität von HABP

Die Messung der enzymatischen Aktivität von HABP wurde über die Spaltung eines chromogenen Substrates durchgeführt. Hierzu wurde die Probe in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 2x Chromogenpuffer auf 50 μL verdünnt und 10 min bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μL 2 mM Pefa-3297-Substratlösung (Pentapharm, Basel, Schweiz) gestartet und gleichzeitig die Hydrolyse des Substrates bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 37°C gemessen. Die Endkonzentration des Substrates Pefa-3297 im Test betrug 1 mM. Die amidolytische Aktivität wurde durch Auswertung der ersten Minute der Substrathydrolyse ermittelt.

Das chromogene Substrat Pefa-3297 (H-D-Pyr-CHG-Arg-pNA) wird durch HABP hydrolytisch gespalten, wodurch im Verlauf der Reaktion der gelbe Farbstoff para-Nitroanilin (p-NA) freigesetzt wird, der ein Absorptionsmaximum bei 405 nm aufweist. Die Freisetzung von p-NA wurde über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Als Messparameter wurde die Steigung der erhaltenen Kurve ermittelt. In Kontrollexperimenten ersetzte Puffer die Probe (Negativkontrolle).

6 Literaturverzeichnis

- Altieri, D. C.** (1995). Xa receptor EPR-1. *FASEB J* **9**, 860-865
- Andreasen, P. A., Sottrup-Jensen, L., Kjoller, L., Nykjaer, A., Moestrup, S. K., Petersen, C. M., and Gliemann, J.** (1994). Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett* **338** (3), 239-245
- Ashcom, J. D., Tiller, S. E., Dickerson, K., Cavens, J. L., Argraves, W. S., and Strickland, D. K.** (1990). The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J Cell Biol* **110** (4), 1041-1048
- Aviezer, D., Cotton, S., and David, M.** (2000). Porphyrin analogues as novel antagonists of fibroblast growth factor receptor binding that inhibit endothelial cell proliferation, tumor progression, and metastasis. *Cancer Res* **60**, 2973-2980
- Baird, T. R. and Walsh, P. N.** (2003). Factor XI, but not prekallikrein, blocks high molecular weight kininogen binding to human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **278** (23), 20618-20623
- Bashkin, P., Klagsbrun, M., Doctrow, S., Shvan, C. M., Folkman, J., and Vlodavsky, I.** (1989). Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparanase and heparin-like molecules. *Biochemistry* **28** (4), 1737-1743
- Belcheva, M. M., Haas, P. D., Tan, T., Heaton, V. M., and Coscia, C. J.** (2002). The fibroblast growth factor receptor is at the site of convergence between μ -opioid receptor and growth factor signaling pathways in rat C6 glioma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **303** (3), 909-918
- Benezra, M., Vlodavsky, I., Ishai-Michaeli, R., Neufeld, G., and Bar-Shavit, R.** (1993). Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* **81** (12), 3324-3331
- Berrettini, M., Schleef, R. R., Heeb, M. J., Hopmeier, P., and Griffin, J. H.** (1992). Assembly and expression of an intrinsic factor IX activator complex on the surface of cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* **267** (28), 19833-19839
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., and Worthy, K.** (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* **44** (1), 1-80
- Blasi, F.** (1994). Protease nexin-1-urokinase complexes are internalized and degraded through a mechanism that requires both urokinase receptor and alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* **269** (27), 17886-17892
- Bockaert, J.** (2002). G Protein-coupled Receptors. In "Encyclopedia of Life Sciences" Nature Publishing Group.
- Bockaert, J. and Pin, J. P.** (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**, 1723-1729

- Bootman, M. D. and Lipp, P.** (2001). Calcium signalling and regulation of cell function. In "Encyclopedia of Life Sciences" Nature Publishing Group.
- Bouchard, B. A., Catcher, C. S., Thrash, B. R., Adida, C., and Tracy, P. B.** (1997). Effector cell protease receptor-1, a platelet activation-dependent membrane protein, regulates prothrombinase-catalyzed thrombin generation. *J Biol Chem* **272**, 9244-9251
- Boyd, K. E. and Farnham, P. J.** (1999). Identification of target genes of oncogenic transcription factors. *Proc Soc Exp Biol Med* **222** (1), 9-28
- Boyle, M. D. P.** (1987). Urokinase: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol* **139** (1), 169-174
- Bradford, H. N., Dela Cadena, R. A., Kanapuli, S. P., Dong, J. F., Lopez, J. A., and Colman, R. W.** (1997). Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* **90** (4), 1508-1515
- Broze, G. J.** (1995). Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* **74**, 90-93
- Brunner, G. and Preissner, K. T.** (1994). Pericellular enzymatic hydrolysis: implications for the regulation of cell proliferation in the vessel wall and the bone marrow. *Blood Coagul Fibrinolysis* **5** (4), 625-639
- Busse, R. and Fleming, I.** (1996). Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes* **45** (Suppl 1), S8-S13
- Busse, R. and Lamontagne, D.** (1991). Endothelium-derived bradykinin is responsible for the increase in calcium produced by angiotensin-converting enzyme inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn Schmiedeberts Arch Pharmacol* **344** (1), 126-129
- Camani, C. and Kruithof, E. K.** (1994). Clearance receptors for tissue-type plasminogen activator. *Int J Hematol* **60** (2), 97-109
- Chavakis, T., Willuweit, A. K., Lupu, F., and Preissner, K. T.** (2001). Release of soluble urokinase receptor from vascular cells. *Thromb Haemost* **86**, 686-693
- Choi-Miura, N. H., Tobe, T., Sumiya, J., Nakano, Y., Sano, Y., Mazda, T., and Tomita, M.** (1996). Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator. *J Biochem (Tokyo)* **119** (6), 1157-1165
- Choi-Miura, N. H., Yoda, M., Saito, K., Takahashi, K., and Tomita M** (2001). Identification of the substrates for plasma hyaluronan binding protein. *Biol Pharm Bull* **24** (2), 140-143
- Christopher, J., Velarde, V., and Jaffa, A. A.** (2001). Induction of B₁-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of MAP kinase activation. *Hypertension* **38** (2), 602-605

- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., and Stern, D. M.** (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-3561
- Clemetson, K. J. and Clemetson, J. M.** (2001). Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* **86** (1), 189-197
- Colden-Standfield, M., Schilling, W. P., Ritchie, A. K., Eskin, S. G., Navarro, L. T., and Kunze, D. L.** (1987). Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* **61**, 632-640
- Collen, D.** (1999). The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thrombosis and Haemostasis* **82** (2), 259-271
- Colman, R. W.** (2001). Contact activation pathway: Inflammatory, fibrinolytic, anticoagulant, antiadhesive, and antiangiogenic activities. In "Hemostasis and thrombosis - Basic principles and clinical practise" (R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, A. W. Clowes, and J. N. George, Eds.), pp. 103-121. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Colman, R. W. and Schmaier, A. H.** (1997). Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* **90** (10), 3819-3843
- Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., and Clowes, A. W.** (2001). Overview of coagulation, fibrinolysis, and their regulation. In "Hemostasis and thrombosis - Basic principles and clinical practice" (R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, A. W. Clowes, and J. N. George, Eds.), pp. 17-20. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Baltimore - New York - London - Buenos Aires - Hong Kong - Sydney - Tokyo.
- Colman, R. W., Pixley, R. A., Najamunnissa, S., Yan, W., Wang, J., Mazar, A., and McCrae, K. R.** (1997). Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* **100** (6), 1481-1487
- Coughlin, S. R.** (2001). Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* **86**, 298-307
- Cugno, M., Hack, C. E., de Boer, J. P., Eerenberg, A. J., Agostini, A., and Cicardi, M.** (1993). Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J Lab Clin Med* **121** (1), 38-43
- Cugno, M., Nussberger, J., Cicardi, M., and Agostini, A.** (2003). Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol* **3** (3), 311-317
- Dahlbeck, B.** (2000). Blood coagulation. *The Lancet* **355**, 1627-1632
- Dammacco, F., Vacca, A., Ribatti, D., and Merchionne, F.** (2000). Angiogenesis und Antiangiogenesis in Neoplasmen. *Die gelben Hefte* **40**, 109-117

- Daub, H., Wallasch, A., Lankenau, A., Herrlich, A., and Ullrich, A.** (1997). Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* **16**, 7032-7044
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, A., and Ullrich, A.** (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**, 557-560
- Davie, J. T. and Ratnoff, O. D.** (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood coagulation. *Science* **145**, 1310-1311
- Déry, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M., and Bunnett, N. W.** (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* **274**, C1429-C1452
- Donaldson, V. H. and Evans, R. R.** (1963). A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C1-esterase. *Amer J Med* **35**, 37-44
- Eliceiri, B. P. and Cheresch, D. A.** (2000). Tumorstadium und Angiogenese. *Die gelben Hefte* **40**, 1-7
- Erdős, E. G.** (1979). "Bradykinin, kallidin and kallikrein. Handbook of Experimental Pharmacology." Springer-Verlag, Heidelberg.
- Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J.** (2002c). Regulation of cellular functions by the hyaluronan-binding protease. *Abstract ISFP Meeting 2002*
- Etscheid, M., Beer, N., Fink, E., Seitz, R., and Dodt, J.** (2002a). The hyaluronan-binding serine protease from human plasma cleaves HMW and LMW kininogen and releases bradykinin. *Biol Chem* **383**, 1633-1643
- Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J.** (2003a). Differential regulation of endothelial cell and lung fibroblast proliferation by the hyaluronan-binding protease. *Ann Hematol* **82** (Suppl 1), S 23
- Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J.** (2003b). Mechanisms involved in the differential regulation of endothelial cells and lung fibroblasts by the hyaluronan-binding protease. *J Thromb Haemost* **1** (7)
- Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J.** (2004). Inhibition of bFGF/EGF-dependent endothelial cell proliferation by the hyaluronan-binding protease from human plasma. *Eur J Cell Biol*, im Druck
- Etscheid, M., Beer, N., Seitz, R., and Dodt, J.** (2002b). Regulation of the plasma hyaluronan-binding serine protease. *Ann Hematol* **81** (Suppl 2), A 16
- Etscheid, M., Hunfeld, A., König, H., Seitz, R., and Dodt, J.** (2000). Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serine protease, by an intermolecular autocatalytical mechanism. *Biol Chem* **381**, 1223-1231
- Fair, D. S. and Plow, E. F.** (1986). Specific association of thrombin-antithrombin complexes with a human hepatoma cell line. *Thromb Res* **41** (1), 67-78

- Fenton, J. W.** (1986). Thrombin. *Ann N Y Acad Sci* **485**, 5-15
- Fink, E., Schill, W. B., Fiedler, F., Krassnigg, F., Geiger, R., and Shimamoto, K.** (1985). Tissue kallikrein of human seminal plasma is secreted by the prostate gland. *Biol Chem Hoppe Seyler* **366**, 917-924
- Fitzgerald, D. J.** (2001). Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion. *Neurology* **57** (5 (Suppl. 2)), S1-S4
- Fleming, I., Fisslthaler, B., and Busse, R.** (1995). Calcium signalling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circ Res* **76**, 522-529
- Folkman, J. and Shing, Y.** (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**, 10931-10934
- Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., and Vlodavsky, I.** (1988). A heparin-binding angiogenic protein - basic fibroblast growth factor - is stored within basement membrane. *Am J Pathol* **130** (2), 393-400
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., and Starke, K.** (1996). "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford.
- Freay, A., Johns, A., Adams, D. J., Ryan, U. S., and van Breemen, C.** (1989). Bradykinin and inositol 1,4,5-triphosphate-stimulated calcium release from intracellular stores in cultured bovine endothelial cells. *Pfluegers Arch* **414**, 377-384
- Gawaz, M.** (1999). "Das Blutplättchen." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Girma, J. P., Meyer, D., Verweij, C. L., Pannekoek, H., and Sixma, J. J.** (1987). Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood* **70**, 605-611
- Grewal, S. S., Fass, D. M., Yao, H., Ellig, C. L., Goodman, R. H., and Stork, P. J. S.** (2000). Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* **275** (44), 34433-34441
- Griffith, M. J.** (1986). Inhibitors: antithrombin III and heparin. In "Blood Coagulation" (R. F. A. Zwaal and H. C. Hemker, Eds.), pp. 259-283. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y.** (1985). A new generation of Ca^{2+} -Chelators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* **260**, 3340-3350
- Gutowski, S., Smrcha, A., Nowak, L., Wu, D., Simon, M., and Sternweis, P.** (1991). Antibodies to the α_q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein α subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J Biol Chem* **266**, 20519-20524
- Hack, C. E. and Eisele, B.** (1998). C1-Esterase-Inhibitor: Indikationen jenseits der klassischen Angioödemtherapie. *Die gelben Hefte* **38**, 120-127

- Hall, J. H.** (1997). Bradykinin receptors. *Gen Pharmac* **28** (1), 1-6
- Hasan, A. A. K., Zisman, T., and Schmaier, A. H.** (1998). Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3615-3620
- Hasan, A. A., Cines, D. B., Ngaiza, J. R., Jaffe, E. A., and Schmaier, A. H.** (1995). High-molecular-weight kininogen is exclusively membrane bound on endothelial cells to influence activation of vascular endothelium. *Blood* **85** (11), 3134-3143
- Hashimoto, K., Tobe, T., Sumiya, J., Saguchi, K., Sano, Y., Nakano, Y., Choi-Miura, N. H., and Tomita, M.** (1997). Cloning of the cDNA for a mouse homologue of human PHBP: a novel hyaluronan-binding protein. *Biol Pharm Bull* **20** (11), 1127-1130
- Hawiger, J.** (2001). Adhesive interactions of blood cells and the vascular wall in hemostasis and thrombosis. In "Hemostasis and thrombosis - Basic principles and clinical practice" (R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, A. W. Clowes, and J. N. George, Eds.), pp. 639-660. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Baltimore - New York - London - Buenos Aires - Hong Kong - Sydney - Tokyo.
- Hecquet, C., Tan, F., Marcic, B. M., and Erdős, E. G.** (2000). Human bradykinin B₂ receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol Pharmacol* **58**, 828-836
- Heldin, C. H.** (2002). Signal transduction: Overview. In "Encyclopedia of Life Sciences" Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Heldin, C. H. and Purton, M.** (1996). "Signal transduction." Chapman & Hall, London, GB.
- Herbert, J. M., Bono, F., Hérault, J. P., Avril, C., Dol, F., Mares, A. M., and Schaeffner, P.** (1998). Effector protease receptor 1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **101** (5), 993-1000
- Herbert, J. M., Dupuy, E., and Laplace, M. C.** (1994). Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochem J* **303**, 227-231
- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Ullrich, A., Schultz, G., and Guderman, T.** (1998). Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic-acid stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8985-8990
- Herz, J. and Strickland, D. K.** (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108** (6), 779-784
- Hickey, M. J., Williams, S. A., and Roth, G. J.** (1989). Human platelet glycoprotein IX: an adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6773-6777

- Hunfeld, A., Etscheid, M., König, H., Seitz, R., and Dodt, J.** (1999). Detection of a novel plasma serine protease during purification of vitamin K-dependent coagulation factors. *FEBS Lett* **456** (2), 290-294
- Ichinose, A., Fujikawa, K., and Suyama, T.** (1986). The activation of prourokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* **261**, 3486-3489
- Ishai-Michaeli, R., Eldor, A., and Vlodavsky, I.** (1990). Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell Regul* **1** (11), 833-842
- Jaffe, E. A.** (1996). Vascular function in hemostasis. In "Williams Hematology" (E. Bentler, M. A. Lichtmann, and B. S. Collier, Eds.), pp. 1261-1276. McGrawHill, New York.
- Jaffe, E. A. and Nachman, R. L.** (1975). Subunit structure of factor VIII antigen synthesized by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **56** (3), 698-702
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R.** (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest* **52** (11), 2745-2756
- Jordan, R. E., Oosta, G. M., Gardner, W. T., and Rosenberg, R. D.** (1980). The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J Biol Chem* **255**, 10081-10090
- Kannemeier, C.** (2003). Zelluläre Funktionen der Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) und die Rolle von extrazellulärer RNA als ein neuer Cofaktor der Enzymaktivierung. *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen*
- Kannemeier, C., Feussner, A., Stöhr, H.-A., Weisse, J., Preissner, K. T., and Römisch, J.** (2001). Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: Activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem* **268** (13), 3789-3796
- Kaplan, A. P.** (1978). Initiation of the intrinsic coagulation and fibrinolytic pathways of man: the role of surfaces, hageman factor, prekallikrein, high molecular weight kininogen, and factor XI. *Prog Hemost Thromb* **4**, 127-175
- Kaplan, A. P., Kusumam, J., Shibayama, Y., Nakazawa, Y., Ghebrehiwet, B., Reddigari, S., and Silverberg, M.** (1998). Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 403-429
- Kirchheimer, J. C.** (1989). Growth stimulation of human epidermal cells by urokinase is restricted to the intact active enzyme. *Eur J Biochem* **181** (1), 103-107
- Knoblauch, B., Kellert, J., Battmann, A., Preissner, K. T., and Römisch, J.** (2002). A histological study of FVII-activating protease (FSAP) distribution in human tissue. *Ann Hematol* **81** (Suppl 1), A 42
- Ko, F. N., Yang, Y. C., Huang, S. C., and Ou, J. T.** (1996). Coagulation factor Xa stimulates platelet-derived growth factor release and mitogenesis in cultured vascular smooth muscle cells of rat. *J Clin Invest* **98** (6), 1493-1501

- Kounnas, M. Z., Church, F. C., Argraves, W. S., and Strickland, D. K.** (1996). Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and α_1 -antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **271** (11), 6523-6529
- Kreuz, W., Fischer, D., Heller, C., Martinez-Saguer, I., and Klarmann, D.** (1998). Substitution des C1-Esterase-Inhibitors bei Hereditärem Angioödem. *Die gelben Hefte* **38**, 109-119
- Kubist, M., Aakerman, B., and Norden, B.** (1987). Characterization of interaction between DNA and 4', 6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* **26** (14), 4545-4553
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Landerman, N. S.** (1962). Hereditary angioneurotic edema. I. Case reports and review of the literature. *J Allergy Clin Immunol* **33**, 316-329
- Lechler, E.** (1982). Prothrombinkomplekonzentrate (Faktor II-VII-IX-X-Komplex) - Eigenschaften und klinische Anwendung. *Hämostaseologie* **49**, 116-127
- Lechner, K.** (1977). Coagulation abnormalities in liver disease. *Semin Thromb Hemost* **4**, 40-56
- Levin, E. G., Marzec, U., Anderson, J., and Harker, L. A.** (1984). Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **74**, 1988-1995
- Liao, J. K. and Homcy, C. J.** (1993). The G proteins of the $G_{\alpha i}$ and $G_{\alpha q}$ family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J Clin Invest* **92**, 2168-2172
- Lijnen, H. R. and Collen, D.** (1980). Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Semin Thromb Hemost* **255**, 10210-10214
- Lin, Y., Harris, R. B., Yan, W., McCrae, K. R., Zhang, H., and Colman, R. W.** (1997). High molecular weight kininogen peptides inhibit the formation of kallikrein on endothelial cell surfaces and subsequent urokinase-dependent plasmin formation. *Blood* **90** (2), 690-697
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, P., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. E.** (2001). "Molekulare Zellbiologie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin.
- Longin, A., Souchier, C., French, M., and Bryon, P. A.** (1993). Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *J Histochem Cytochem* **41** (12), 1833-1840
- Lopez, J. A., Chung, D. W., Fujikawa, K., Hagen, F. S., Davie, E. W., and Roth, G. J.** (1988). The alpha and beta chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2135-2139

- Lückhoff, A., Pohl, U., Mülsch, A., and Busse, R.** (1988). Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol* **95**, 189-196
- Macfarlane, R. G.** (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **202**, 498-499
- Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., and Plevin, R.** (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 245-282
- Mahdi, F., Shariat-Madar, Z., Todd, R. F., Figueroa, C. D., and Schmaier, A. H.** (2001). Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells. *Blood* **97** (8), 2342-2350
- Mann, K. G.** (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* **82** (2), 165-175
- Mann, K. G., Nesheim, M. E., Church, W. R., Haley, P., and Krishnaswamy, S.** (1990). Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* **76** (1), 1-16
- Marceau, F. and Bachvarov, D. R.** (1998). Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 385-401
- Matthias, F. R.** (1996). Das Capillary Leak-Syndrom. *Die gelben Hefte* **36**, 185-190
- McCarthy, D. A., Potter, D. E., and Nicolaidis, E. D.** (1965). An *in vivo* estimation of the potencies and half-lives of synthetic bradykinin and kallidin. *J Pharmacol Exp Ther* **148**, 117-122
- McLean, P. G., Perretti, M., and Ahluwalia, A.** (2000). Kinin B₁ receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* **48**, 194-210
- McNamara, C. A., Sarembock, I. J., and Gimple, L. W.** (1993). Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* **91**, 94-98
- Miyazawa, K., Wang, Y., Minoshima, S., Shimizu, N., and Kitamura, N.** (1998). Structural organization and chromosomal localization of the human hepatocyte growth factor activator gene - phylogenetic and functional relationship with blood coagulation factor XII, urokinase, and tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* **258** (2), 355-361
- Moestrup, S. K., Gliemann, J., and Pallesen, G.** (1992). Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res* **269** (3), 375-382
- Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B. K., Hubbard, S. R., and Schlessinger, J.** (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-960

- Moroi, M. and Aoki, N.** (1976). Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J Biol Chem* **251**, 5956-5965
- Mustonen, T. and Alitalo, K.** (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* **129** (4), 895-898
- Nakazawa, F., Kannemeier, C., Trusheim, H., Engelmann, B., and Preissner, K. T.** (2003a). A new factor triggering blood coagulation: The long sought natural "foreign" surface. *Ann Hematol* **82** (Suppl 1), S 7
- Nakazawa, F., Kannemeier, C., Trusheim, H., Koyama, T., and Preissner, K. T.** (2003b). An intracellular cofactor of factor VII activating protease (FSAP) functions as an initiator of blood coagulation. *J Thromb Haemost* **1** (7)
- Nussberger, J., Cugno, M., Amstutz, C., Cicardi, M., Pellacani, A., and Agostoni, A.** (1998). Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* **351** (9117), 1693-1697
- Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E. I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J., and Blasi, F.** (1997). Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complex. *EMBO J* **16** (10), 2610-2620
- Olson, D., Pöllänen, J., Hoyer-Hansen, G., Ronne, E., Sakaguchi, K., Wun, T.-C., Appella, E., Dano, K., and Blasi, F.** (1992). Internalization of the urokinase-plasminogen activator inhibitor type-1 complex is mediated by the urokinase receptor. *J Biol Chem* **267** (13), 9129-9133
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.** (2002). c-Myc: More than just a matter of life and death. *Nat Rev Canc* **2** (10), 764-776
- Petersen, G. L.** (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol* **91**, 95-119
- Petty, H. R. and Todd, R. F.** (1996). Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* **17** (5), 209-212
- Ploug, M., Ronne, E., Behrendt, N., Jensen, N., Blasi, F., and Dano, K.** (1991). Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* **266**, 1926-1933
- Pöllänen, J.** (1991). Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. *Adv Cancer Res* **57**, 273-328
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., and Wellstein, A.** (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* **7**, 165-197
- Preissner, K. T.** (2000). Hemostatic protease receptors and endothelial cell function: insights from gene targeting in mice. *Semin Thromb Hemost* **26** (5), 451-462
- Preissner, K. T., Nawroth, P. P., and Kanse, S. M.** (2000). Vascular protease receptors: integrating haemostasis and vascular cell functions. *J Pathol* **190**, 360-372
- Pschyrembel, W.** (2002). "Klinisches Wörterbuch." de Gruyter, Berlin.

- Quinn, P. G.** (2002). Mechanisms of basal and kinase-inducible transcription activation by CREB. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 269-305
- Regoli, D. and Barabé, J.** (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* **32**, 1-46
- Renné, T., Dedio, J., David, G., and Müller-Esterl, W.** (2000). High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells. *J Biol Chem* **275** (43), 33688-33696
- Renné, T., Müller-Esterl, W., and Walter, U.** (2003). Proteoglycans dock kininogens to cells and regulate generate bradykinin generation. *J Thromb Haemost* **1** (7)
- Rogers, J.** (1983). Exon shuffling and intron insertion in serine protease genes. *Nature* **315**, 458-459
- Römisch, J., Feußner, A., and Stöhr, H. A.** (1999a). The FVII activating protease mediates fibrinolytic effects activating single-chain plasminogen activators. *Ann Hematol* **78** (Suppl 1), A 24
- Römisch, J., Feussner, A., Nerlich, C., Stöhr, H. A., and Weimer, T.** (2002). The frequent Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of the factor VII activating protease (FSAP). *Blood Coagul Fibrinolysis* **13** (5), 433-441
- Römisch, J., Feußner, A., Vermöhlen, S., and Stöhr, H. A.** (1999b). A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* **10** (8), 471-479
- Römisch, J., Vermöhlen, S., Feußner, A., and Stöhr, H. A.** (1999b). A protease isolated from plasma which activates FVII in a tissue factor independent manner but inactivates FV and FVIII. *Ann Hematol* **78** (Suppl 1), A 10
- Römisch, J., Vermöhlen, S., Feußner, A., and Stöhr, H. A.** (2000). The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis* **29**, 292-299
- Rosenberg, R. D. and Damus, P. S.** (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* **248**, 6490-6505
- Ruggeri, Z. M.** (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* **8** (11), 1227-1234
- Ruggeri, Z. M. and Zimmermann, T. S.** (1987). Von Willebrand factor and von Willebrand factor disease. *Blood* **70**, 895-904
- Saksela, O. and Rifkin, D. B.** (1990). Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* **110** (3), 767-775
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A., and Rifkin, D. B.** (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* **107**, 743-751

- Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z. M.** (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* **94** (5), 657-666
- Schapira, M., Silver, L. D., Scott, C. F., Schmaier, A. H., Prograis, L., Curd, J., and Colman, R. W.** (1983). Prekallikrein activation and high molecular weight kininogen consumption in hereditary angiodedema. *N Engl J Med* **308** (18), 1050-1053
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225
- Schmaier, A. H.** (2000). Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr Opin Hematol* **7**, 261-265
- Schmaier, A. H., Kuo, A., Lundberg, D., Murray, S., and Cines, D. B.** (1988). The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **263**, 16327-16333
- Schmaier, A. H., Rojkaer, R., and Shariat-Madar, Z.** (1999). Activation of the plasma kallikrein/kinin system on cells: a revised hypothesis. *Thromb Haemost* **82** (2), 226-233
- Schoel, B., Welzel, M., and Kaufmann, S. H.** (1995). Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay. *J Biochem Biophys Methods* **30** (2-3), 199-206
- Schousboe, I.** (1993). Contact activation in human plasma is triggered by zinc ion modulation of factor XII (Hageman factor). *Blood Coagul Fibrinolysis* **4** (5), 671-678
- Segev, A., Aviezer, D., Safran, M., Gross, Z., and Yayon, A.** (2002). Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by a novel fibroblast growth factor receptor antagonist. *Cardiovasc Res* **53**, 232-241
- Sheikh, I. A. and Kaplan, A. P.** (1986). Studies of the digestion of bradykinin, Lys-bradykinin, and des-Arg9-bradykinin by angiotensin converting enzyme. *Biochem Pharmacol* **35** (12), 1951-1956
- Shore, J. D., Day, D. E., Bock, P. E., and Olson, S. T.** (1987). Acceleration of surface-dependent autocatalytic activation of blood coagulation factor XII by divalent metal ions. *Biochemistry* **26** (8), 2250-2258
- Silbernagl, S. and Despopoulos, A.** (2003). "Taschenatlas der Physiologie." Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.
- Silverberg, M., Nicoll, J. E., and Kaplan, A. P.** (1980). The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor. *Thromb Res* **20** (2), 173-189

- Sporn, L. A. and Huber, P.** (2001). Endothelial cell biology. In "Hemostasis and thrombosis - Basic principles and clinical practice" (R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, A. W. Clowes, and J. N. George, Eds.), pp. 615-623. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Baltimore - New York - London - Buenos Aires - Hong Kong - Sydney - Tokyo.
- Storck, J., Hunfeld, A., and Dodt, J.** (1999). A new human plasma serine protease activates endothelial cells. *Pfluegers Arch Eur J Physiol* **437** (Suppl 5), R 164
- Sumiya, J., Asakawa, S., Tobe, T., Hashimoto, K., Saguchi, K., Choi-Miura, N. H., Shimizu, Y., Minoshima, S., and Tomita, M.** (1997). Isolation and characterization of the plasma hyaluronan-binding protein (PHBP) gene (HABP2). *J Biochem (Tokyo)* **122** (5), 983-990
- Takagaki, Y., Kitamura, N., and Nakanishi, S.** (1985). Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. *J Biol Chem* **260** (14), 8601-8609
- Takeya, H., Hamada, T., Kume, M., and Suzuki, K.** (1994). Receptor-mediated endocytosis of thrombin-antithrombin III complex by the human monocytoid cell line U937. *Biochem Biophys Res Commun* **200** (3), 1334-1340
- Thompson, R. E., Mandle, R., and Kaplan, A. P.** (1979). Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (10), 4862-4866
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, T.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (9), 4350-4354
- van Iwaarden, F., de Groot, P. G., and Bouma, B. N.** (1988a). The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* **263**, 4698-4703
- van Iwaarden, F., de Groot, P. G., Sixma, J. J., Berrettini, M., and Bouma, B. N.** (1988b). High-molecular weight kininogen is present in cultured human endothelial cells: localization, isolation, and characterization. *Blood* **71** (5), 1268-1276
- Vassalli, J. D., Baccino, D., and Belin, D.** (1985). A cellular binding site for the Mr 55 000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* **100**, 86-92
- Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J., and Klagsbrun, M.** (1987). Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (8), 2292-2296
- Vostrov, A. A. and Quitschke, W. W.** (2000). Plasma hyaluronan-binding protein is a serine protease. *J Biol Chem* **275** (30), 22978-22985
- Voyta, J. C., Netland, P. A., Via, D. P., and Zetter, B. R.** (1984a). Specific labeling of endothelial cells using fluorescent acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99** (6), 2034-2040

- Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E., and Zetter, B. R.** (1984b). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99** (6), 2034-2040
- Whitelock, J. M., Murdoch, A. D., Iozzo, R. V., and Underwood, P. A.** (1996). The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanase. *J Biol Chem* **271** (17), 10079-10086
- Wiggins, R. C. and Cochrane, C. G.** (1979). The autoactivation of rabbit Hageman factor. *Exp Med* **150** (5), 1122-1133
- Willeit, J., Kiechl, S., Weimer, T., Mair, A., Santer, P., Wiedermann, C. J., and Römisch, J.** (2003). Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation* **107** (5), 667-670
- Yang, H. Y. T., Erdös, E. G., and Levin, Y.** (1971). Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II; angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther* **177**, 291-300
- Yayon, A., Aviezer, D., Safran, M., Gross, J. L., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D., and Katchalski-Katzir, E.** (1993). Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitpe library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10643-10647
- Zhang, J. C., Claffey, K., Sakthivel, R., Darzynkiewicz, Z., Shaw, D. E., Leal, J., Wang, Y.-C., Lu, F.-M., and McCrae, K. R.** (2000). Two chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB Journal* **14**, 2589-2600
- Zhao, Y., Qiu, Q., Mahdi, F., Shariat-Madar, Z., Rojkaer, R., and Schmaier, A. H.** (2001). Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280** (4), H1821-H1829

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

α_1 AT	α_1 -Antitrypsin
α_1 PI	α_1 -Proteinase-Inhibitor
α_2 AP	α_2 -Antiplasmin
α_2 M	α_2 -Makroglobulin
α_2 MR	α_2 -Makroglobulin-Rezeptor
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläre Calcium-Konzentration
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
APC	aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
B2R	B2-Rezeptor
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BK	Bradykinin
BSA	Rinderserumalbumin
C1-INH	C1-Inhibitor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EPCR	Endothelialer Protein C-Rezeptor
EPR-1	<i>effector cell protease receptor-1</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	<i>extracellular- signal regulated kinase</i>
FBS	fetales Rinderserum

FGFR	FGF-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HABP	Hyaluronsäure-bindende Protease
HAE	Hereditäres Angioödem
HAEC	<i>human umbilical artery endothelial cell</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGFA	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator
HK	HMW-Kininogen
HKa	aktiviertes HMW-Kininogen
HMTS	<i>HEPES-modified Tyrode's solution</i>
HMW	hochmolekular
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LK	LMW-Kininogen
LKc	geschnittenes LMW-Kininogen
LMW	niedermolekular
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierbare Proteinkinase
min	Minute
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAR	Protease-aktivierbarer Rezeptor
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>

PN1	Protease-Nexin-1
pNA	<i>p</i> -Nitroanilid
PPACK	D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon
PVDF	Polyvinylidenfluoridmembran
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TF	<i>tissue factor</i>
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TNS	Trypsin-Neutralisierungs-Lösung
tPA	Gewebsplasminogen-Aktivator
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
uPA	Urokinase
uPAR	Urokinase-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	von Willebrand-Faktor
w/v	Gewicht pro Volumen

Für die Aminosäuren wurde der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet:

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Aspartat	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutamat	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

7.2 Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Kreß, J., Seitz, R., Dodt, J., and Etscheid, M. (2004). Intracellular signaling in human endothelial cells induced by the hyaluronan-binding protease. (in Vorbereitung)

Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J. (2004). Inhibition of bFGF/EGF-dependent endothelial cell proliferation by the hyaluronan-binding protease from human plasma. *European Journal of Cell Biology* (im Druck)

Kreß, J., Seitz, R., Dodt, J., and Etscheid, M. (2003). Intracellular signaling in human endothelial cells induced by the hyaluronan-binding protease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis (Suppl. 1)*. XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Birmingham, GB

Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J. (2003). Mechanisms involved in the differential regulation of endothelial cells and lung fibroblasts by the hyaluronan-binding protease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis (Suppl. 1)*. XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Birmingham, GB

Kreß, J., Seitz, R., Dodt, J., and Etscheid, M. (2003). Differential activation of human endothelial cells by the hyaluronan-binding protease. *Annals of Hematology, Suppl. 1, Vol. 82: S 51*. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Innsbruck, A

Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J. (2003). Differential regulation of endothelial cell and lung fibroblast proliferation by the hyaluronan-binding protease. *Annals of Hematology, Suppl. 1, Vol. 82: S 23*. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Innsbruck, A

Kreß, J., Beer, N., Seitz, R., Dodt, J., and Etscheid, M. (2002). Interaction of the hyaluronan-binding protease with human endothelial cells. 16th International Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP), München

Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J. (2002). Regulation of cellular functions by the hyaluronan-binding protease. 16th International Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP), München

Etscheid, M., Beer, N., Kreß, J., Seitz, R., and Dodt, J. (2002). Hyaluronan-binding serine protease from human plasma: a novel kininogenase. Kinin 2002, The 16th International Conference, Charleston, SC, USA

Kreß, J., Seitz, R., Dodt, J., and Etscheid, M. (2002). Interaction of the plasma hyaluronan-binding serine protease with extracellular matrix proteins. *Annals of Hematology, Suppl. 1, Vol. 81: A 47*. 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Erfurt

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Julia Anne Kreß
Geburtsdatum: 30.05.1975
Geburtsort: Marburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1981 – 07/1985 Wiegand-Gerstenberg-Schule (Grundschule) in Frankenberg
08/1985 – 06/1994 Edertalschule (Gymnasium) in Frankenberg
06/1994 Abitur

Studium

10/1994 – 12/1999 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
10/1994 - 10/1996 Grundstudium
10/1996 Diplomvorprüfung
10/1996 – 12/1999 Hauptstudium
10/1998 Diplomhauptprüfung
11/1998 - 11/1999 Diplomarbeit im Fachgebiet Genetik am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Böcker

Thema: „Molekulare Charakterisierung des *ndr1*-Gens aus *Ustilago maydis*“

12/1999 Abschluss des Studiums und Erreichen des akademischen Grades „Diplom-Biologin“

Promotion

seit 04/2000 Promotion am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Leitung von Herrn PD Dr. J. Dodt und Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg)

Thema: „Zelluläre Funktionen der Hyaluronsäure-bindenden Protease (HABP): Aufklärung intrazellulärer Signalwege in humanen Endothelzellen“

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung während meiner Doktorandenzeit die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben:

Herrn Prof. Dr. R. Seitz danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung und das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn PD Dr. J. Dodt danke ich ganz herzlich für die sehr gute Betreuung, seine fachliche Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Betreuung meiner Arbeit an der Philipps-Universität Marburg.

Bei Frau Prof. Dr. Hassel und Herrn Prof. Dr. Batschauer bedanke ich mich vielmals für die Bereitschaft, Mitglieder der Prüfungskommission zu sein.

Herrn Dr. M. Etscheid, Frau N. Beer und Frau A. Corda bin ich für viele Diskussionen und Gespräche sowie für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung im Labor sehr dankbar.

Herrn Dr. H. König und seinen Mitarbeiterinnen danke ich sehr für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Calcium-Messungen.

Bei Herrn Dr. K. Boller möchte ich mich für die Hilfe bei den Immunfluoreszenz-experimenten bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Schuhmann von der Asklepios-Klinik Langen danke ich für die zur Verfügung gestellten Nabelschnüre.

Herrn Prof. Dr. E. Fink (Universitätsklinikum München) danke ich für die Durchführung der Radioimmunoassays.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht und mich jederzeit unterstützt haben.

Dir, lieber Henning, danke ich ganz herzlich für soviel Geduld, Verständnis, Unterstützung und Aufmunterung!

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Zelluläre Funktionen der Hyaluronsäure-bindenden Protease (HABP):

Aufklärung intrazellulärer Signalwege in humanen Endothelzellen

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) in Zusammenarbeit mit dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) in Langen selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Frankfurt (Main), 05.02.2004
